

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Miloš R. Stanojlović

**EFEKAT ESTRADIOLA U MODULACIJI
APOPTOTSKIH SIGNALA U MOŽDANOJ
KORI I HIPOKAMPUSU PACOVA TOKOM
HRONIČNE MOŽDANE HIPOPERFUZIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Miloš R. Stanojlović

**EFFECTS OF ESTRADIOL ON
MODULATION OF APOPTOTIC SIGNALS
IN CEREBRAL CORTEX AND
HIPPOCAMPUS OF RATS DURING
CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

Dr Dunja Drakulić, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Dr Nadežda Nedeljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr Anica Horvat, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Dr Mirjana Stojiljković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Dr Ivana Grković, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata „Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama centralnog nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara“ (173044, rukovodilac dr Anica Horvat) i „Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju“ (41014, rukovodilac dr Sanja Peković), koje finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Od srca se zahvaljujem dr Anici Horvat na pruženoj podršci, poverenju i omogućenim adekvatnim uslovima za eksperimentalni rad, kao i na ukazanom strpljenju, pažnji, brizi i nemešljivom doprinosu u mom profesionalnom i ličnom razvoju.

Iskreno se zahvaljujem prof. dr Mirjani Stojiljković koja je tokom mog celokupnog fakultetskog obrazovanja bila prisutna i uticala na moje opredeljenje ka neuro naukama. Hvala za pokazivanje, na sopstvenom primeru, da sve može biti urađeno na lepši način.

Prof. dr Nadeždi Nedeljković se zahvaljujem na pruženoj profesionalnoj podršci, nesebičnoj pomoći i želji da podeli svoje veliko znanje. Hvala na dragocenim i korisnim savetima koji su doprineli da ova teza, i ja kao istraživač dobijemo svoj oblik.

Zahvaljujem dr Ivani Grković za pregledanje teze i korisne sugestije koje su učinile da tekst bude čitljiviji, kao i na prijateljskoj podršci, dostupnosti i mnogobrojnim značajnim diskusijama.

Zahvalnost koju rečima ne mogu dovoljno dobro iskazati dugujem Dunji.

Hvala Nataši i maloj Ivani na pomoći, podršci, razumevanju i lepim trenucima. Zadovoljstvo je raditi sa vama.

Kolegama iz drugih grupa dugujem zahvalnost za pomoć znanjem, materijalom i prijateljstvom.

Hvala mojoj porodici. Vi ste moje korenje ...

REZIME:

Efekat estradiola u modulaciji apoptotskih signala u moždanoj kori i hipokampusu pacova tokom hronične moždane hipoperfuzije

Iako se ishemijske bolesti mozga, koje se karakterišu pogoršanjem motornih i kognitivnih funkcija, uključujući smanjenje sposobnosti učenja i memorije, intenzivno proučavaju poslednjih 20 godina malo je poznato o molekulskim mehanizmima njihovog nastanka, kao i odgovarajućim terapijama. Osnovni cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita efekat hroničnog tretmana polnim hormonom, estradiolom, na apoptotske puteve u kortikalnim i hipokampalnim ćelijama polno zrelih mužjaka pacova Wistar soja u stanju nametnute hronične moždane hipoperfuzije. Tome je predhodilo proučavanje efekta moždane hipoperfuzije na složenu kaskadu apoptotskih signalnih puteva u kori prednjeg mozga i hipokampusu pacova u različitim vremenskim tačkama.

Za potrebe prvog dela eksperimenta jedna grupa pacova je lažno operisana, dok je druga grupa podvrgnuta operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija. Jedinke obe grupe su ostavljene na preživljavanju 3, 7 ili 90 dana. Za potrebe drugog dela eksperimenta pacovi su podeljeni u dve grupe: životinje kojima su trajno podvezane zajedničke karotidne arterije, tretirane 7 dana lanenim uljem i jedinke podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija i tretirane 7 dana estradiolom (33.3 µg/kg/dan, rastvoren u lanenom ulju). Praćeni su sledeći parametri: obim neuralne smrti, fragmentacija DNK koja je karakteristična za apoptozu, kao i promene u ekspresiji proteina i iRNK markera procesa ćelijske smrti odnosno preživljavanja ćelija.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da se u zadatim eksperimentalnim uslovima, u kori prednjeg mozga u ranim vremenskim tačkama javljaju neurodegenerativne promene koje prate ekspresiju apoptotskih molekula u neprečišćenoj membranskoj frakciji, dok se u kasnije aktiviraju adaptivni i kompenzatorni mehanizmi. U hipokampusu je uočen specifičan vremenski-zavisan trend ekspresije analiziranih pro- i anti-apoptotskih molekula koji dovode do pojave odložene ćelijske smrti. Na osnovu proučavanja efekata hroničnog tretmana malim dozama estradiola u stanju nametnute moždane hipoperfuzije može se zaključiti da ovaj potentni polni hormon ima kapacitet da oblikuje odgovor ispitivanih moždanih

struktura. Naime, anti-apoptotski efekat delovanja estradiola se ogleda u modulaciji i nishodnoj regulaciji ispitivanih markera mitohondrijskog puta apoptoze. Takođe, na osnovu dobijenih rezultata za neprečišćenu membransku, citosolnu, mitohondrijsku i jedarnu frakciju obe ispitivane moždane strukture može se pretpostaviti da su protektivni efekti estradiola manje izraženi u neprečišćenoj membranskoj frakciji ili da su promene nastale pod uticajem ishemije znatnije u ovoj ćelijskoj frakciji, stoga primenjeni tretman nije dovoljan da ublaži efekte povrede.

Dodatna istraživanja delovanja estradiola unutar mozga mogla bi omogućiti razvoj novih terapijskih strategija za modulaciju odgovora specifičnih ćelija i moždanih struktura uključenih u kogniciju, formiranje memorije i učenje kod starih osoba, kao i obolelih od progresivnih neurodegenerativnih bolesti, čime bi se znatno poboljšao kvalitet njihovih života.

Ključne reči: moždana hipoperfuzija, estradiol, mozak, apoptoza/preživljavanje, pacov

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Neurobiologija

UDK BROJ: [612.38::616.8-003.8](043.3)

ABSTRACT

Effects of estradiol on modulation of apoptotic signals in cerebral cortex and hippocampus of rats during chronic cerebral hypoperfusion

Although ischemic brain diseases, characterized by decline of motor and cognitive functions, including reducing the ability of learning and memory, have been intensively studied over the past 20 years, the molecular mechanisms of their generation, as well as appropriate treatments are still matter of controversy. The main goal of this PhD thesis was to investigate the effects of repeated estradiol treatment on apoptotic pathways in cortical and hippocampal cells of adult male Wistar rats in a state of imposed chronic cerebral hypoperfusion. This was preceded by the study of the effects of cerebral hypoperfusion on complex cascade of apoptotic signalling pathways in the cerebral cortex and hippocampus of rats at different time points.

For the purposes of the first part of the experiment, one group of rats was sham operated, while the other group was subjected to permanent ligation of common carotid arteries. Animals were sacrificed 3, 7 or 90 days following the insult. For the second part of the experiment, the rats were divided into two groups: animals that underwent permanent common carotid artery occlusion, treated for 7 days with linseed oil and rats subjected to permanent ligation of the common carotid arteries, treated for 7 days with estradiol (33.3 µg/kg/day, dissolved in linseed oil). Parameters that were monitored are: volume of neuronal death, DNA fragmentation typical for apoptosis, as well as changes in mRNA and protein expressions of cell death or survival markers.

The results obtained in this dissertation indicate that in cerebral cortex at two early investigated time points, the expression of apoptotic molecules in synaptosomal fraction is accompanied with neurodegenerative changes, while later adaptive and compensatory mechanisms are activated. In hippocampus, a specific time-dependent expression of analyzed pro- and anti-apoptotic molecules is associated with delayed apoptotic death. Furthermore, according to gained data, repeated estradiol treatment in state of imposed chronic cerebral hypoperfusion exerts a potent capacity to profile the response of investigated brain structures, through modulation of expression of mitochondrial apoptotic pathway markers. Also, results for synaptosomal, cytosolic, mitochondrial and nucleus fractions of both investigated brain structures, point that protective effects of estradiol are either less pronounced in synaptosomal fraction or ischemic changes in this

cell fraction are significant, thus applied treatment is not sufficient to compensate the effects of the injury.

Additional research of estradiol activity in the brain could enable the development of new therapeutic strategies to modulate the response of specific cells and brain structures involved in cognition, memory formation and learning in the elderly and patients with progressive neurodegenerative disease, which would significantly improve the quality of their lives.

Keywords: cerebral hypoperfusion, estradiol, brain, apoptosis/survival, rat

RESEARCH AREA: Biology

RESEARCH FIELD: Neurobiology

UDC NUMBER: [612.38::616.8-003.8](043.3)

SADRŽAJ

UVOD	1
1. BOLESTI MOŽDANE CIRKULACIJE, MOŽDANA ISHEMIJA	2
1.1. POJAM, MOGUĆI MEHANIZMI NASTANKA I POSLEDICE MOŽDANE ISHEMIJE	2
1.2. TIPOVI MOŽDANE ISHEMIJE	5
1.3. ŽIVOTINJSKI MODELI GLOBALNE MOŽDANE ISHEMIJE	6
1.3.1. Modeli potpune globalne moždane ishemije	7
1.3.2. Modeli nepotpune globalne moždane ishemije	7
2. STRUKTURA I FUNKCIONALNA ORGANIZACIJA KORE PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSA	10
2.1. KORA PREDNJEG MOZGA	10
2.1.1. Prečeaona moždana kora	11
2.2. LIMBIČKI REŽANJ	12
2.2.1. Hipokampusna formacija	13
3. OSETLJIVOST MOŽDANIH STRUKTURA NA ISHEMIJU	14
4. ĆELIJSKA SMRT	15
4.1. APOPTOZA	16
4.2. POKRETANJE APOPTOTSKE KASKADE	17
4.2.1. Spoljašnji put apoptoze	18
4.2.2. Unutrašnji put apoptoze	19
4.2.2.1. <i>Proteini unutrašnjeg puta apoptoze</i>	20
Bcl-2 familija proteina	20
Kaspaze	22
PARP	23
Citohrom C	24
5. ESTROGENI	25
6. ESTRADIOL I ISHEMIJA MOZGA	27
CILJ RADA	30
MATERIJALI I METODE	33
1. MATERIJALI	34
2. METODE	36
2.1. POSTUPAK SA ŽIVOTINJAMA	36
2.2. TRAJNE BILATERALNE OKLUZIJE KAROTIDNIH ARTERIJA	36
2.3. TRETMAN ESTRADIOLOM	37
2.4. ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA I PRIPREMA TKIVA	37
2.5. ANALIZA FRAGMENTISANOSTI ĆELIJSKE DNK POMOĆU DIFENILAMIN METODE	38
2.6. BOJENJE SA FLUORO-JADE B I HOECHST 33258	38
2.7. IZOLOVANJE PROTEINA ZA WESTERN BLOT ANALIZU	39
2.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	41
2.9. ELEKTROFOREZA PROTEINA I WESTERN BLOT ANALIZA	42
2.9.1. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	42
2.9.2. „Western blot“ analiza	42
2.10. IZOLACIJA RNK I PRIPREMA UZORAKA ZA RTQPCR	43
2.10.1. Izolacija RNK	43
2.10.2. Precipitacija RNK	44

2.10.3. Određivanje koncentracije RNK	44
2.10.4. RNK elektroforeza	45
2.10.5. Reverzna transkripcija (RT)	45
2.10.6. Određivanje ekspresije gena za Bcl-2 i Bax tehnikom PCR-a u realnom vremenu	45
3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	46

REZULTATI	47
------------------	-----------

1. EFEKAT OPERACIJE PODVEZIVANJA ZAJEDNIČKIH KAROTIDNIH ARTERIJA NA SMRTNOST I TELESNU MASU JEDINKI	48
2. EFEKAT MOŽDANE HIPOPERFUZIJE NA BROJ MRTVIH ČELIJA U KORI PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSU	48
3. FRAGMENTACIJA JEDARNE DNK U KORI PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH PODVEZIVANJU ZAJEDNIČKIH KAROTIDNIH ARTERIJA	49
4. EFEKAT MOŽDANE HIPOPERFUZIJE NA REGULATORE APOPTOZE U KORI PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSU	51
4.1. VREMENSKI ZAVISAN ODGOVOR KORE PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSA U STANJU MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	51
5. ODGOVOR PREČEONE KORE I HIPOKAMPUSA NA TRETMAN ESTRADIOLOM U STANJU HRONIČNE MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	59
5.1. EFEKAT HRONIČNOG TRETMANA ESTRADIOLOM NA BROJ MRTVIH ČELIJA U PREČEONJOJ KORI I HIPOKAMPUSU U STANJU MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	59
5.2. FRAGMENTACIJA JEDARNE DNK U PREČEONJOJ KORI I HIPOKAMPUSU ŽIVOTINJA IZLOŽENIH HRONIČNOM TRETMANU ESTRADIOLOM U STANJU NAMETNUTE MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	61
5.3. EFEKAT TRETMANA ESTRADIOLOM NA SUBĆELIJSKU DISTRIBUCIJA I GENSKU EKSPRESIJU BCL-2 I BAX U PREČEONJOJ KORI I HIPOKAMPUSU U STANJU HRONIČNE MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	61
5.4. EFEKAT TRETMANA ESTRADIOLOM NA SUBĆELIJSKU DISTRIBUCIJA PRO-APOPTOTSKIH ENZIMA—CITOHROMA C, PROKASPAZE 3, SEČENE KASPAZE 3 I PARP U PREČEONJOJ KORI I HIPOKAMPUSU U STANJU HRONIČNE MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	67

DISKUSIJA	72
------------------	-----------

1. MOŽDANA HIPOPERFUZIJA, STOPA PREŽIVLJAVANJA I PROMENE SISTEMSKIH PARAMETARA	74
2. ULOGA MOŽDANE HIPOPERFUZIJE U NEURODEGENERATIVNIM PROMENAMA	76
3. VREMENSKI PROFIL APOPTOTSKE SIGNALIZACIJE U KORI PREDNJEG MOZGA I HIPOKAMPUSU U NAKON NAMETANJA STANJA MOŽDANE HIPOPERFUZIJE	78
4. NEURODEGENERACIJA I APOPTOTSKA SIGNALIZACIJA U MOZGU ODRASLIH PACOVA U USLOVIMA HRONIČNE HIPOPERFUZIJE NAKON TRETMANA ESTRADIOLOM	83

LITERATURA	93
-------------------	-----------

PRILOZI	112
----------------	------------

SKRAČENICE

ADP	adenozin-5'-difosfat
AIF	faktor indukcije apoptoze (eng. <i>apoptosis inducing factor</i>)
Akt	protein kinaza B
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropanoična kiselina
APAF-1	faktor aktivacije apoptotičnih proteaza 1 (eng. <i>apoptotic protease activating factor 1</i>)
Asp	aspartat
ATP	adenozin trifosfat
A1	eng. <i>Bcl-2-related protein A1</i>
Bad	eng. <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	eng. <i>Bcl-2 antagonistic killer</i>
Bax	eng. <i>Bcl-2 associated X protein</i>
Bcl-2	eng. <i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	eng. <i>Bcl-extra long</i>
Bcl-xs	eng. <i>Bcl-extra short</i>
Bcl-w	eng. <i>Bcl-2-like protein 2</i>
BH	Bcl-2 homologi domen
Bid	eng. <i>Bcl-2 interacting domain death agonist</i>
Boo	eng. <i>Bcl-2 homolog of ovary</i>
BRCA 1	eng. <i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BSA	goveđi serumski albumin
Ca ²⁺ ATPaza	kalcijum transportujuća ATP-aza
CA	Amonov rog (lat. <i>cornu ammonis</i>)
CAD	DNKaze aktivirane kaspazama (eng. <i>caspase activated DNAase</i>)
CARD	domen aktivacije kaspaze (eng. <i>caspase activating and recruitment domain</i>)
CytC	citohrom C
Ctx	kora prednjeg mozga (lat. <i>cortex cerebralis</i>)
Cys	cistein
ddH ₂ O	bidestilovana voda
DED	Efektorni domeni smrti (eng. <i>death effector domain</i>)
DEPC	dietilpirokarbonat
DD	domeni smrti (eng. <i>death domains</i>)
DISC	eng. <i>death inducing signaling complex</i>
DNK-aza	DNK endonukleaza
DR	receptori smrti (eng. <i>death receptors</i>)
DTT	ditiotreitol
E	estradiol (17 β -estradiol)
ECL	eng. <i>enchanced chemiluminiscence</i>
EDTA	etilendiamino-tetrasirćetna kiselina
EGTA	etilenglicerol-tetrasirćetna kiselina

EndoG	endonukleaza G
ER	estrogeni receptor
FADD	eng. <i>fas-associated death domain</i>
FasR	TNF-6 receptor
FSH	foliko-stimulirajući hormon
G-protein	guanozin nukleotid-vezujući protein
GAPDH	glicerid-3-fosfat-dehidrogenaza
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (eng. <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
Gly	glicin
GnRH	gonadotropno-oslobađajući hormon
HHA	hipotalamo-hipofizno-nadbubežna osa
HHG	hipotalamo-hipofizno-gonadalna osa
Hipp	Hipokampusna formacija (lat. <i>formatio hippocampi</i>)
His	histamin
HRP	peroksidaza iz rena
IAP	inhibitor apoptoze (eng. <i>inhibitor of apoptosis</i>)
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
IP3	inozitol-3-fosfat
LH	lutenizirajući hormon
K	kontrola
kaspaze	eng. <i>cysteine aspartyl-specific proteases</i>
MAPK	mitogenom-aktivirane protein kinaze
MARP	eng. <i>mono-(ADP-ribose) polymerase</i>
MCAO	eng. <i>middle cerebral artery occlusion</i>
Mcl-1	faktor-1 leukemije mijeloidne ćelije
mGlu	metabotropni glutamatni receptori
MPC-1	hemoatraktant monocita proteina-1 (eng. <i>monocyte chemotactic protein-1</i>)
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NMDA	N-metil-D-aspartat
NFM	nemasno mleko u prahu (eng. <i>nonfat milk powder</i>)
NO	azot oksid
NOS	azot-oksidi sintetaza
NuMa	eng. <i>Nuclear Mitotic Apparatus protein</i>
OD	optička gustina (eng. <i>optical density</i>)
PAA	poliakrilamid
PAR	eng. <i>poly (AD-ribose)</i>
PARG	eng. <i>poly (ADP-ribose) glycohydrolase</i>
PARP	eng. <i>poly-(ADP-ribose) polymerase</i>
PCA	perhlorna kiselina
PD	postoperativni dan

PFA	paraformaldehid
Pfc	prečeaona moždana kora (lat. <i>cortex praefrontalis</i>)
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PVDF	poliviniliden fluorid
P2	gruba membranska frakcija
RIP	receptorski interagujući protein (eng. <i>receptor integrating protein</i>)
RPL19	„kućepaziteljski” gen za ribozomalni protein L19 (eng. <i>60S ribosomal protein L19</i>)
ROS	reaktivne kiseonične vrste (eng. <i>reactive oxygen species</i>)
RTqPCR	kvantitativna reverzno transkripciona lančana reakcija polimeraze
SEM	standardna greška merenja (eng. <i>standard error of measurement</i>)
SDS	natrijum dodecil sulfat
SMAC	eng. <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>
TEMED	N,N,N',N'- tetrametildiamin
TNF- α	faktor nekroze tumora- α (eng. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TNFR1	TNF receptor 1
TRADD	protein koji vezuje kompleks TNF-receptor (eng. <i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>)
2VO	metoda podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija (eng. <i>two vessel occlusion</i>)
4VO	metoda podvezivanja zajedničkih karotidnih i vertebralnih arterija (eng. <i>four vessel occlusion</i>)

UVOD

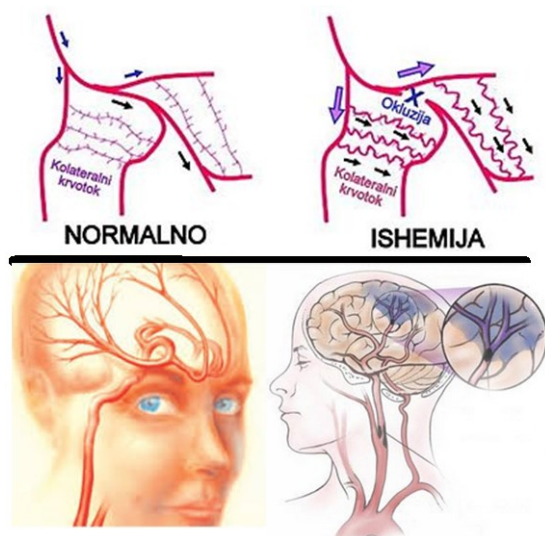
1. Bolesti moždane cirkulacije, moždana ishemija

Bolesti moždane cirkulacije drugi su vodeći uzrok smrti u razvijenim zemljama sveta i peti u nerazvijenim (Fuster i Kelly, 2010). Najčešći oblici ovih bolesti su moždana tromboza, embolija i krvarenje (Schutta i Lechtenberg, 1998). Sva navedena stanja dovode do ishemijskih oštećenja mozga, koja se mogu razlikovati po intenzitetu i trajanju.

Pogoršanje kognitivnih funkcija, uključujući smanjenje sposobnosti učenja i pamćenja, uobičajene su u ishemijskim bolestima mozga i predstavljaju glavni faktor smanjenja kvaliteta života (Inagaki i Etgen, 2013). Zbog toga, mehanizmi nastanka ovih oboljenja, kao i odabir odgovarajućih terapija kojima bi se poboljšao kvalitet života obolelih, predstavlja predmet intenzivnih proučavanja mnogih studija poslednjih 20 godina.

1.1. Pojam, mogući mehanizmi nastanka i posledice moždane ishemije

Moždana ishemija se, zajedno sa subarahnoidnim i unutar-moždanim krvarenjem, kategoriše kao podtip moždanog udara.

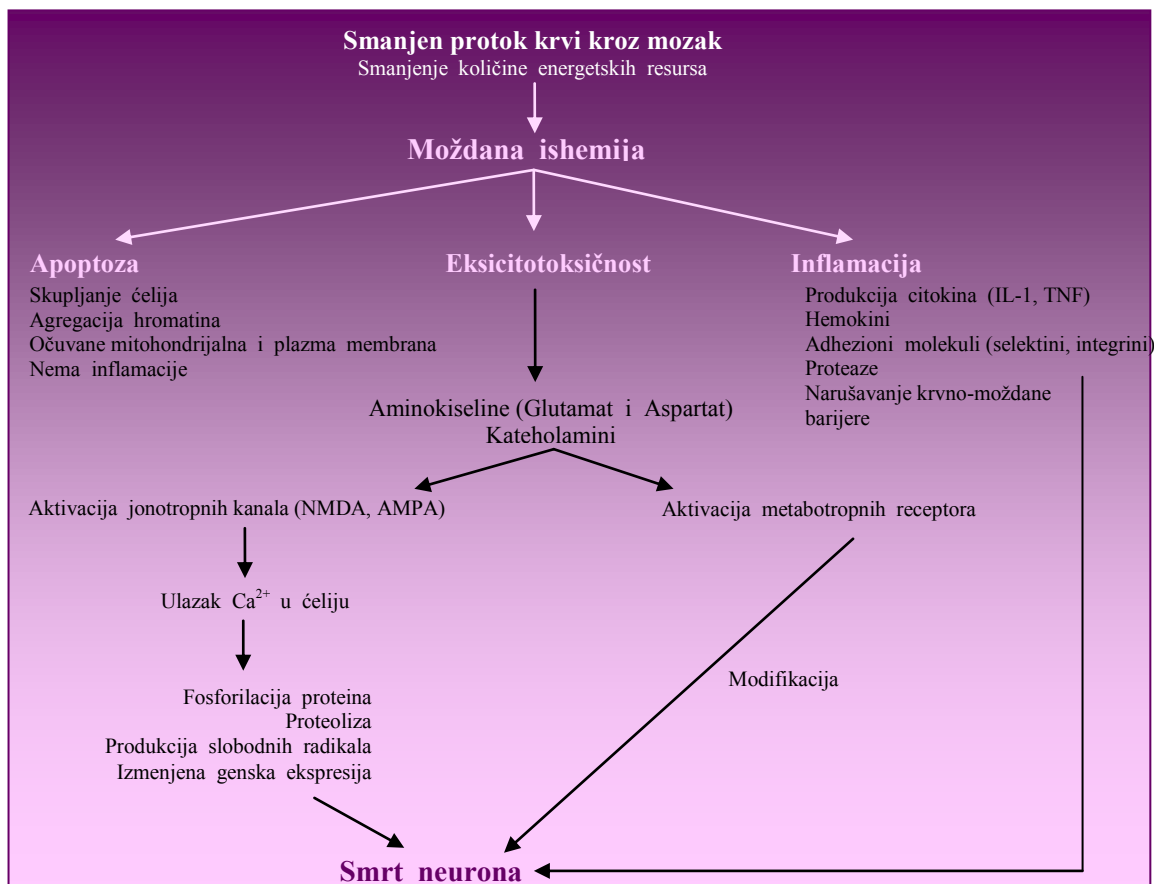


Slika 1. Protok krvi kroz mozak u fiziološkim i patološkim uslovima odnosno u stanju ishemije.

Ovo patološko stanje okarakterisano je smanjenjem protoka krvi kroz mozak, što za posledicu ima nedovoljno snabdevanje moždanog tkiva glukozom i kiseonikom. Usled smanjenja moždane cirkulacije ispod određenog nivoa u kraćem vremenskom intervalu nastaje ishemično stanje u mozgu, dok dalje smanjenje protoka krvi ili produžavanje vremena trajanja ishemije dovodi do smrti neurona (Harukuni i Bhardwaj, 2006).

Uzroci nastanka moždane ishemije mogu biti različiti. Osim začepljenja (eng. *occlusion*) i patološkog suženja (lat. *stenosis*) krvnih sudova, moždana ishemija se javlja i usled nepravilnosti rada srca, trajno niskog pritiska kao posledice srčanog udara ili urođenih srčanih mana, poremećaja disanja (apnea, dispnea, bradipnea, itd), upotrebe

lekova i narkotika, hirurških intervencija, kao i različitih oboljenja poput srpaste anemije, Mojamvoja sindroma i dr (Farkas i saradnici, 2007).



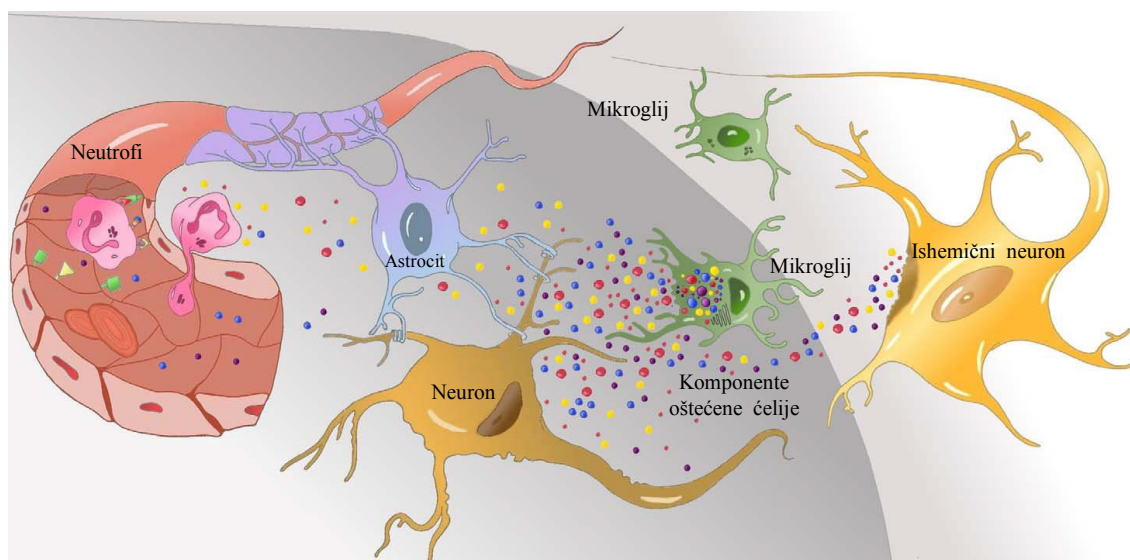
Slika 2. Mogući mehanizmi nastanka oštećenja moždanog tkiva u stanju smanjenog protoka krvi kroz mozak (www.chronopause.com).

U stanju ishemije, u mozgu brzo se troše postojeće male zalihe ATP (adenozin trifosfata). To dovodi do prestanka rada Na,K-ATPaze, povećanja vanćelijske koncentracije K^+ i unutarćelijske koncentracije Na^+ što dovodi do depolarizacije membrane neurona (Farkas i saradnici, 2007). Takođe, Ca^{2+} -ATP-aza (kalcijum transportujuća ATP-aza) prestaje sa radom što uzrokuje povećanje koncentracije Ca^{2+} u ćeliji i aktivaciju Ca^{2+} -zavisnih proteaza, lipaza i dezoksiribonukleaza (DNK-aza). Depolarizacija membrane uslovljava i oslobađanje pobuđujućeg (ekscitatornog) neurotransmitera glutamata, koji se u normalnim uslovima u citoplazmi nalazi u koncentraciji ~ 10 mM, dok je u sinaptičkoj pukotini njegova koncentracija i do hiljadu puta manja (Hsu, 1998). Povećanje koncentracije glutamata u sinapsama iznad 1 mM dovodi do povećane aktivacije jonotropnih glutamatnih receptora, NMDA i AMPA (Slika 2).

Aktivacija NMDA i AMPA receptora uslovljava ulazak jona Na^+ i Ca^{2+} i izlazak K^+ iz ćelije, čime se, u normalnim uslovima obezbeđuje električna sinaptička aktivnost i plastičnost (Zito i saradnici, 2009). Sa druge strane, u ishemičnim uslovima propustljivost AMPA receptora značajno raste uslovljavajući povećano oslobađanje glutamata i pojavu odložene ćelijske smrti zavisne od Ca^{2+} (Liu i saradnici, 2006), dok NMDA receptori omogućavaju dalji ulazak Ca^{2+} u ćelije, uzrokujući pojavu ekscitotoksičnosti (Olney, 1969). Treba istaći da se stanje koje nastaje usled velike količine Ca^{2+} u ćelijama pogoršava usled povećane količine mlečne kiseline i smanjenja pH vrednosti, što dalje uzrokuje pojavu acidoze koja predstavlja jedan od neurohemijskih elemenata anaerobnog metabolizma tokom ishemije (Simon, 2006). Takođe, uočeno je da i metabotropni glutamatni receptori (mGlu) doprinose ekscitotoksičnosti povećavajući nadražljivost neurona i delujući na NMDA i AMPA receptore, dok u zavisnosti od intenziteta i trajanja ishemijskog stimulusa aktivacija ovih receptora može dovesti i do iniciranja procesa nekroze (Doyle i saradnici, 2008).

Ishemija dovodi do aktivacije azot-oksida sintaze (NOS) enzima koji katališe reakciju sinteze azot-mono oksida (NO) koji sa superoksidom daje potentni oksidativni agens, peroksinitrit. Superoksid, NO i peroksinitrit aktiviraju matriksne metaloproteaze koje razgrađuju kolagen i proteine iz porodice laminina, narušavajući strukturu i funkciju zidova krvnih sudova. Ovi agensi povećavaju i propustljivost krvno-moždane barijere. Visoki nivo Ca^{2+} , Na^+ i adenzin-5'-difosfata (ADP) podstiču nastanak dodatnih količina reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) u mitohondrijama, koje dalje narušavaju strukturu i funkciju ćelijskih makromolekula i aktiviraju signalne puteve apoptoze (Halliwell, 1994).

U ishemičnom stanju mozga dolazi i do inflamatornog odgovora, koji je složen i uključuje aktivaciju različitih ćelija, kao i membranskih receptora i posrednika zapaljenja (*Slika 3*). U zavisnosti od tipa aktiviranih receptora i signalnih puteva, citokini, hemokini i njima posredovana aktivacija ćelija može doprineti pogoršanju stanja tokom ishemije mozga, ali i ispoljiti neuroprotektivni efekat. Tako, odumiranje neurona u stanju ishemije dovodi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u međućelijski prostor, uzrokujući pojavu inflamatornog odgovora i snažnu aktivaciju fagocita, čime se smanjuje broj oštećenih ćelija i količina štetnih materija u međućelijskom prostoru i ispoljava neuroprotektivni efekat (Ceulemans i saradnici, 2010).



Slika 3. Shematski prikaz neuroinflamatornog odgovora u stanju ishemije (Ceulemans i saradnici, 2010).

Sa druge strane, primećeno je da oksidativni stres izazvan ishemijom može dovesti do značajnog pada broja leukocita, regrutacije i migracije neutrofila i monocita koji oslobađanjem enzima doprinose daljoj degradaciji i povećanju propustljivosti krvno-moždane barijere (Crack i Taylor, 2005) i time izazivaju dodatno T ćelijama posredovano inflamatorno oštećenje neurona (Ross i saradnici, 2007).

1.2. Tipovi moždane ishemije

U zavisnosti od obima tkiva zahvaćenog ishemijskim procesima, moždana ishemija može biti fokalna i globalna.

1) **Fokalna moždana ishemija** nastaje usled drastičnog smanjenja protoka krvi u određenom regionu mozga. Ovaj tip ishemije obično se javlja kao posledica začepljenja krvnih sudova mozga prilikom tromboze ili embolije, a najčešća manifestacija ovih procesa je moždani udar. U tkivu zahvaćenom fokalnom moždanom ishemijom uočavaju se dva regiona tzv. ishemijsko jezgro i senka (lat. *penumbra*). Ova dva regiona se međusobno razlikuju na osnovu funkcijskih i morfoloških karakteristika, imajući u vidu ekspresiju različitih gena, proteina i aktivaciju različitih signalnih puteva. Ishemijsko jezgro je region direktno pogođen ishemijom i predstavlja centar oštećenja, okarakterisan prisustvom izraženih nekrotičnih promena nastalih usled značajnog smanjenja protoka krvi kroz mozak, nedovoljne količine kiseonika, glukoze i ATP. S druge strane, senka je region oko jezgra, posredno zahvaćen ishemijom, te u njemu

promene nisu tako drastične kao u samom jezgru. Unutar ovog regiona ćelije pretežno umiru procesom apoptoze (Smith i saradnici, 2005).

2) **Globalna moždana ishemija** nastaje usled potpunog ili delimičnog smanjenja protoka krvi, pada nivoa ATP, kiseonika i glukoze u određenim regionima mozga ili celom mozgu. Kod ovog tipa ishemije oštećenja se uočavaju na pojedinačnim ćelijama (Harukuni i Bhardwaj, 2006). Ukoliko se moždana cirkulacija vrati na normalni nivo u kraćem vremenskom periodu, nastale promene mogu biti reverzibilne. Međutim, i brzo vraćanje nivoa protoka krvi na bazalni nivo tj. reperfuzija dovodi do oštećenja koja često prevazilaze ona nastala usled same ishemije, budući da moždano tkivo nema sposobnost da se brzo prilagodi naglim promenama krvnog pritiska i cirkulacije krvi (Pan i saradnici, 2007).

U zavisnosti od dužine trajanja ishemije razlikuju se privremena i trajna globalna moždana ishemija. **Privremena globalna moždana ishemija** predstavlja vremenski ograničeno potpuno ili delimično smanjenje protoka krvi kroz mozak koje najčešće nastaje usled srčanog zastoja, šoka, gušenja ili kod pacijenata koji su podvrgnuti ozbiljnim operacijama srčanog mišića (Harukuni i Bhardwaj, 2006) i može dovesti do delirijuma, nastanka kognitivnih poremećaja, kao i do smrti. S druge strane, **trajna globalna moždana ishemija** (trajna hipoperfuzija) se odlikuje dugotrajnim umerenim smanjenjem moždane cirkulacije, do kog dolazi usled arterio-venoznih oštećenja, začepjenja ili sužavanja karotidnih arterija (Hossmann, 2006, 1997, 1993). Ovaj tip ishemije je karakterističan za procese starenja, ali i za različite neurodegenerativne bolesti, kao što su demencija, Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Roher i saradnici, 2012; Hai i saradnici, 2010; Firbank i saradnici, 2002).

1.3. Životinjski modeli globalne moždane ishemije

Kod životinjskih modela moždane ishemije, smanjuje se ili prekida protok krvi kroz moždano tkivo u cilju potpunog ili delimičnog oponašanja stanja koja nastaju kod ljudi u uslovima privremene i trajne moždane hipoperfuzije (Gupta i Briyal, 2004; Traystman, 2003; Ginsberg i Busto, 1989). Iako se za modele globalne moždane ishemije koriste različite životinjske vrste, iz više razloga najčešće se upotrebljavaju pacovi. Neke prednosti pacova kao model-organizma su sledeće: (1) sličnost sa ljudima na nivou moždane anatomije i fiziologije; (2) veličine koja omogućava laku analizu fizioloških parametara moždanog tkiva; (3) troškovi uzgajanja; (4) genetska

homogenost unutar pojedinih sojeva; (5) etička prihvatljivost njihovog korišćenja u odnosu na veće životinje.

U zavisnosti od jačine ishemije koja se nameće mogu se razlikovati modeli potpune i nepotpune globalne moždane ishemije.

1.3.1. Modeli potpune globalne moždane ishemije

Potpuna globalna moždana ishemija nastaje kada se protok krvi kroz mozak u potpunosti spreči odnosno zaustavi. Izazivanje zastoja rada srca koji prati srčano-plućno oživljavanje kod velikih eksperimentalnih životinja i glodara, je tehnika kojom se izaziva potpuna globalna moždana ishemija i uključuje kompletnu ishemiju i reperfuziju u bubrezima, crevima i drugim perifernim organima.

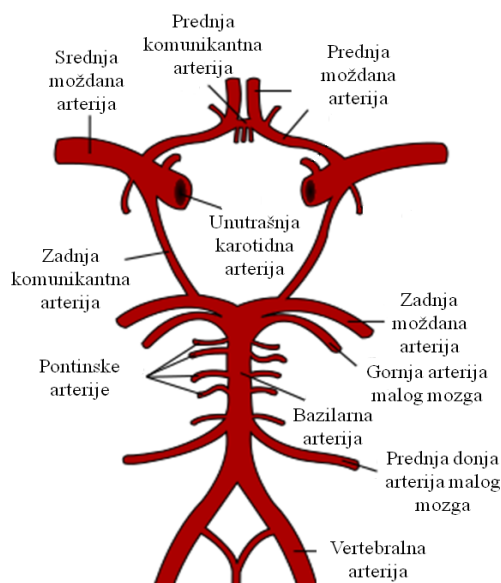
Kod malih životinja, poput glodara, koristi se dekapitacija kao model potpune globalne moždane ishemije za izučavanje samo nekih biohemijskih i metaboličkih parametara u ranoj fazi ishemije (Yoshida i saradnici, 1985a,b; Abe i saradnici, 1983; Lowry i saradnici, 1964). Stezači vrata ili okovratnici, bez obzira da li uključuju arterijsku hipotenziju ili ne, takođe se koriste radi izazivanja potpune globalne moždane ishemije kod pacova, mačaka, pasa ili majmuna. Međutim, ovi modeli daju nereproducibilne rezultate, budući da se ovakvim pristupom može izazvati kompresija vagusa i sprečavanje protoka krvi kroz pojedine vene što uzrokuje pojavu i nekompletne globalne moždane ishemije (Sheller i saradnici, 1992; Chopp i saradnici, 1989).

1.3.2. Modeli nepotpune globalne moždane ishemije

Nepotpuna globalna moždana ishemija nastaje usled delimičnog smanjenja moždane cirkulacije, a nameće se podvezivanjem krvnih sudova, smanjenjem krvnog pritiska ili hipoksijom.

Zajedničke karotidne arterije (lat. *arteria carotis communis*) i vertebralne arterije (lat. *arteria vertebralis*) su krvni sudovi koji snabdevaju mozak kiseonikom i hranljivim materijama kod ljudi i pacova. U bazi lobanje, ove arterije uz pomoć prednjih (lat. *arteria communicans anterior*) i zadnjih komunikantnih arterija (lat. *arteria communicans posterior*) formiraju kružnu formaciju nazvanu Vilisov krug (Martin i saradnici, 1997). Vertebralne arterije se pre ulaska u Vilisov krug spajaju u bazilarnu arteriju (lat. *arteria basilaris*) koja ima brojne kolaterale označene kao pontinske arterije

(lat. *arteriae ad pontem*). Od ove strukture polaze prednja moždana arterija (lat. *arteria cerebri anterior*), srednja moždana arterija (lat. *arteria cerebri media*), zadnja moždana arterija (lat. *arteria cerebri posterior*) kao i gornja arterija malog mozga (lat. *arteria cerebelli superior*). Takođe, od Vilisovog kruga polaze i prednje, donje arterije malog mozga (lat. *arteria cerebelli anterior inferior*) koje nastaju grananjem vertebralnih arterija (**Slika 4**).



Slika 4. Shematski prikaz Vilisovog kruga (www.emedicine.medscape.com)

podvezivanjem zajedničkih karotidnih arterija (eng. *two vessel occlusion*, 2VO), uzrokuje se smanjenje opšteg protoka krvi gotovo do nule (Kirino, 1982). Kod životinja koje nemaju potpun Vilisov krug, poput pustinjskog miša, obostranim podvezivanjem zajedničkih karotidnih arterija (eng. *two vessel occlusion*, 2VO), uzrokuje se smanjenje opšteg protoka krvi gotovo do nule (Kirino, 1982). Sličan model se kod pacova, koji imaju zatvoren Vilisov krug, dobija podvezivanjem svih zajedničkih karotidnih i vertebralnih arterija (eng. *four vessel occlusion*, 4VO). U prvim koracima procedure, vertebralne arterije se trajno podvezuju na 24 ili 48 sati, kasnije se vrši kratkotrajno (10–20 minuta) podvezivanje zajedničkih karotidnih arterija pod lakom inhalacionom anestezijom, kako bi se ishemijska epizoda javila dok je životinja svesna. Na ovaj način se protok krvi kroz mozak smanjuje na ~5 % kontrolnih vrednosti, koje je praćeno hiperemijom u periodu od 5–15 minuta nakon reperfuzije. Posledična hipoperfuzija koja traje 24 sata uslovljava nastanak velikih neuronalnih oštećenja u hipokampusu, kori prednjeg mozga i prugastom telu (lat. *corpus striatum*), koja su po obimu direktno

Razlike u anatomiji velikih krvnih sudova koji formiraju Vilisov krug kod čoveka i pacova gotovo da ne postoje i uglavnom se odnose na upotrebu različitih termina u njihovom imenovanju (Estaves i saradnici, 2013).

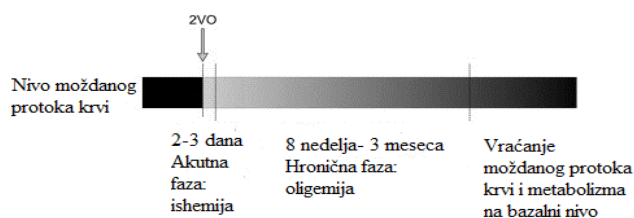
Pošto karotidne i vertebralne arterije formiraju kružnu strukturu, smanjen protok krvi prouzrokovan okluzijom nekog od ovih krvnih sudova može, donekle, biti nadomešten. Kod životinja koje nemaju potpun Vilisov krug, poput pustinjskog miša, obostranim

srazmerna trajanju ishemije. Efekti ove procedure su, međutim, prilično različiti u zavisnosti od soja pacova, kao i među pojedinačnim jedinkama (Ginsberg i Busto, 1989; Pulsinelli i Buchan, 1988).

Za razliku od 4VO, 2VO model kod pacova je hirurški jednostavnija procedura, obim neurodegeneracije je manji i stopa preživljavanja životinja je veća. U poređenju sa modelom podvezivanja dva krvna suda kod pustinjaskog miša, praćenje fizioloških promena je znatno lakše (Farkas i saradnici, 2007).

U zavisnosti od dužine trajanja nametnute ishemije u modelu 2VO, kod pacova se mogu pratiti promene nastale usled privremene ili trajne hipoperfuzije. U modelu privremene hipoperfuzije glavni uzrok neurodegenerativnih promena predstavlja sama reperfuzija. Povratak moždane cirkulacije na bazalni nivo praćen je oštećenjima koja nastaju usled nagle promene krvnog pritiska, količine kiseonika i glukoze.

Model trajne 2VO podrazumeva nametanje dugotrajne umerene hipoperfuzije i omogućava praćenje promena koje nastaju tokom nekoliko nedelja. Protok krvi je najviše smanjen u kori i beloju masi prednjeg mozga (~40 % kontrolnih vrednosti) i hipokampusu (~60 % kontrolnih vrednosti), dok zbog nepodvezanih vertebralnih arterija kičmena moždina, mali mozak i moždano stablo ne trpe ishemijska oštećenja.



Slika 5. Promene nivoa moždanog protoka krvi i metabolizma koje su posledica 2VO (Farkas i saradnici, 2007).

Na osnovu protoka krvi kroz mozak i metaboličkog stanja tkiva promene koje nastaju u ovom modelu mogu se podeliti u tri faze: akutnu, hroničnu i fazu oporavka (**Slika 5**).

Akutna faza nastupa nakon podvezivanja arterija i traje 2–3 dana. Niske vrednosti protoka krvi u ovom periodu dovode do stanja hipoksije i ishemije koji narušavaju elektrofiziološku aktivnost mozga (Marosi i saradnici, 2006). Nakon ove faze javlja se **faza hronične hipoperfuzije**, koja traje oko 8 nedelja. U ovom periodu javlja se umerena hipoglikemija sa oligemijom. Već nakon 7 dana od trenutka okluzije počinje postepen oporavak moždane cirkulacije, međutim, procesi ishemije prestaju tek nakon dužeg vremenskog perioda. Stanje koje nastaje tokom faze hronične hipoperfuzije najviše odgovara promenama koje se javljaju prilikom trajnog smanjenja prokrvljenosti moždanog tkiva kod ljudi (Wakabayashi i Karbowski, 2001; Smith i saradnici, 1984).

To omugaćava lakše ispitivanje uloge trajne moždane ishemije u oštećenju nervnog tkiva i smanjenju kognitivnih sposobnosti prilikom starenja, demencije i Alchajmerove bolesti (Farkas i saradnici, 2007). Konačno, zahvaljujući kompenzatornim mehanizmima, nastupa **faza oporavka**, moždana cirkulacija se vraća na nivo pre podvezivanja krvnih sudova uslovljavajući postepen nestanak hronične hipoperfuzije, ishemijskih procesa i neurodegeneracije (Farkas i saradnici, 2007).

2. Struktura i funkcionalna organizacija kore prednjeg mozga i hipokampusa

2.1. Kora prednjeg mozga

Kora prednjeg mozga (lat. *cortex cereбрalis*) je relativno tanak sloj (u proseku 2 mm kod pacova, 4 mm kod čoveka) nervnog tkiva koji pokriva hemisfere prednjeg mozga i ima značajnu ulogu u brojnim funkcijama, uključujući i formiranje memorije, održavanje pažnje, percepciji, povezivanju različitih aspekata ponašanja, itd. Zbog prisustva tela neurona i krvnih sudova na površini je siva boja, dok je bela masa, koja se nalazi ispod kore, prvenstveno izgrađena od mijelinizovanih aksona (Kendal i saradnici, 2000). U kori prednjeg mozga uočeno je više tipova neurona, poput piramidnih, granularnih, zvezdastih, horizontalnih, vretenastih, Marinotijevih, itd.

Treba istaći da je kora prednjeg mozga slojevite građe i u zavisnosti od broja slojeva odnosno filogenetske starosti struktura koje ga izgrađuju može se podeliti na neokorteks i alokorteks. Neokorteks predstavlja najveći deo kore velikog mozga i sastoji se iz šest slojeva: (I) molekularni koji sadrži mali broj neurona; (II) spoljašnji granularni; (III) spoljašnji piramidalni; (IV) unutrašnji granularni; (V) unutrašnji piramidalni; (VI) multiformni. Svaki od ovih slojeva sadrži neurone različitih oblika, veličine, gustine i organizacije nervnih vlakana. Funkcionalno, slojevi kore prednjeg mozga mogu biti podeljeni na supragranularni (slojevi I–III), unutrašnji granularni (sloj IV) i infragranularni sloj (slojevi V–VI). U supragranularnom sloju nalaze se: asocijativne (između istih hemisfera) i komisuralne veze (između različitih hemisfera, uglavnom preko žuljevitog tela (lat. *corpus callosum*). Ovaj sloj naročito je razvijen kod ljudi i omogućava komunikaciju između istih naspramnih regiona dve hemisfere mozga. Na neuronima unutrašnjeg granularnog sloja završavaju se talamičke projekcije, naročito u

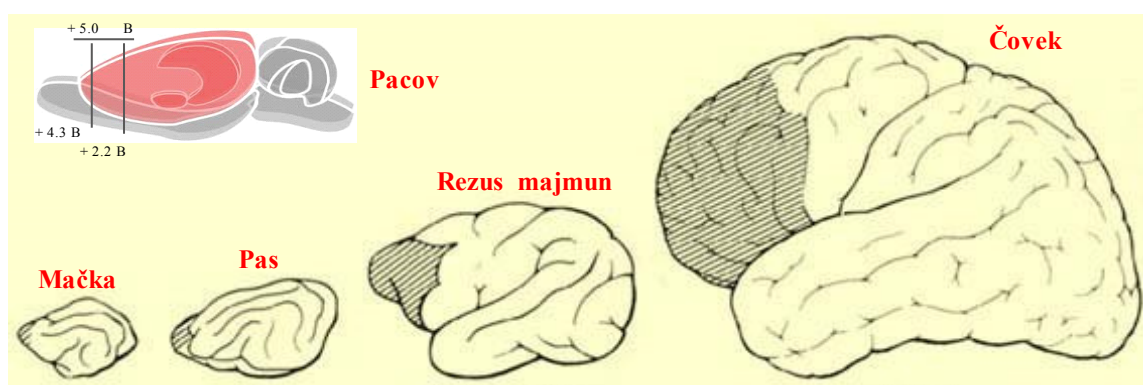
somatosenzornoj kori (Swenson, 1989). Iz infragranularnog sloja polaze aksoni koji ostvaruju veze sa nižim strukturama.

Kora prednjeg mozga se na osnovu uloge u različitim procesima može podeliti na prečeonu, motornu, senzornu, vizuelnu i auditornu oblast.

2.1.1. Prečeaona moždana kora

Prečeaona moždana kora (lat. *cortex prefrontalis*) je sastavni deo kore prednjeg mozga. Između vrsta su uočene razlike u funkcionalnim ali, i anatomskim karakteristikama (*Slika 6*).

Kod ljudi, prečeaona moždana kora je odgovorana za regulaciju ponašanja, posredovanje u obradi suprotstavljenih ideja, pravljenju izbora i predviđanju ishoda akcija ili događaja. Takođe, reguliše hipotalamo-hipofizno-nadbubežnu (HHA) osu, rukovodi supresijom emocionalnih i seksualnih potreba, kao i uspostavljanjem društveno-prihvatljivog ponašanja. S obzirom na to da je prečeaona kora odgovorna za primanje informacija i reagovanje, smatra se da je ova moždana struktura odgovorna za savesnost, opštu inteligenciju i crte ličnosti (Goldman-Rakic i saradnici, 1996). Sa druge strane, kod pacova zadužena je za radnu memoriju, formiranje osećaja o proticanju vremena, planiranje, fleksibilnost i plastičnost u ponašanju i donošenju odluka (Raymond i saradnici, 2001).



Slika 6. Prečeaona kora.

Mnoge studije na pacovima ukazuju da njihova prečeaona moždana kora odgovara pljosnatoj kori (lat. *gyrus cingulatus*) i dorzolateralnoj prečeaonoj moždanoj kori primata (Seamans i saradnici, 2008). Ova struktura kod pacova se uslovno se može podeliti na tri topološki različita regiona: (1) **medijalna prečeaona moždana kora**– glavni deo medijalnog zida hemisfera, smeštena anteriorno i dorzalno od žuljevitog tela; (2)

orbitalna prečeaona moždana kora– ventralni region kore, nalazi se na dorzalnom i kaudalnom kraju mirisne kvržice (lat. *bulbus olfactorius*) u dorzalnom kraju rinalnog useka; i (3) **lateralna prečeaona moždana kora**– locirana u anteriornom delu rinalnog useka, naziva se još i agranularna insularna kora (Heidbreder i Groenewegen, 2003).

Prečeaona moždana kora ostvaruje veze sa talamusom (medio-dorzalnim, ventro-medijalnim, intra-laminarnim, anterio-medijalnim i jedrima središnje linije, rostralnim delovima ventralnog kompleksa talamusa), bazalnim ganglijama, kao i različitim regionima moždane kore (premotornom, somatosenzornom, auditornom, vizualnom, olfaktornom, gustatornom i limbičkom) (Uylings i saradnici, 2003). Kod ljudi i pacova, medijalna prečeaona moždana kora je jedini region koji poseduje direktne projekcione veze sa bazalnim acetilholinskim prednjim mozgom, jedrima moždanog stabla, kao i dorzalnim i medijalnim rubnim jedrima (lat. *nuclei raphe*). Dopaminske ulazne projekcione veze, medijalna prečeaona moždana kora ostvaruje sa ventralnom tegmentalnom oblašću ventralnim krovom srednjeg mozga (lat. *tegmentum mesencephali*) i crnom materijom (lat. *substantia nigra*) (Seamens i saradnici, 2008; Heidbreder i Groenewegen, 2003; Ongur i Price, 2000).

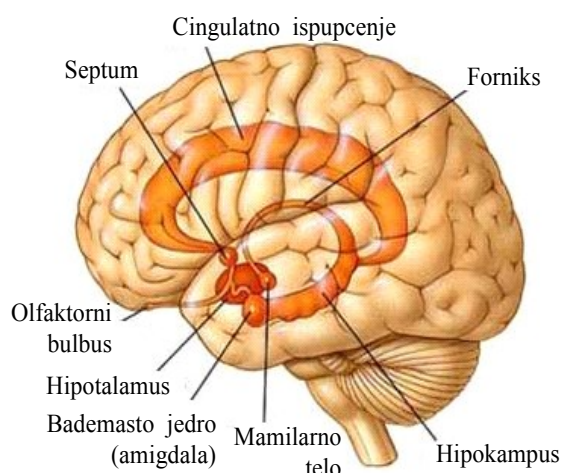
Narušena funkcija, smanjena zapremina i umanjen broj neuronskih veza unutar prečeaone moždane kore, uočava se kod pacijenata sa različitim mentalnim oboljenjima, kod samoubica, sociopata i zavisnika od narkotika (Cecil i saradnici, 2008; Liston i saradnici, 2006; Rajkowska, 1997).

Prečeaona moždana kora zajedno sa nekoliko funkcionalno i anatomske povezanih moždanih struktura prednjeg mozga, srednjeg mozga i međumozga ulazi u sastav limbičkog sistema.

2.2. Limbički režanj

Limbički režanj (lat. *lobus limbicus*) je skup anatomske definisanih, blisko povezanih struktura uključenih u regulaciju sličnih procesa. Ova struktura obuhvata delove medijalnog regiona kore prednjeg mozga, čeonog, temenog i slepoočnog režnja. U sastav limbičkog režanja ulaze pojasna vijuga (lat. *gyrus cingulatus*), parahipokampalna vijuga (lat. *gyrus hippocampus*), hipokampusna formacija, subkalozalna vijuga (lat. *gyrus subcallosus*), parolfaktorna vijuga (lat. *gyrus parolfactorius*) i preterminalna

vijuga (lat. *gyrus preterminalis*). Sve navedene strukture, zajedno sa strukturama u drugim regionima, mamilarnim jedrima (lat. *corpus mamillare*), bademastim jedrima



Slika 7. Komponente limbičkog sistema (www.brainmeta.com).

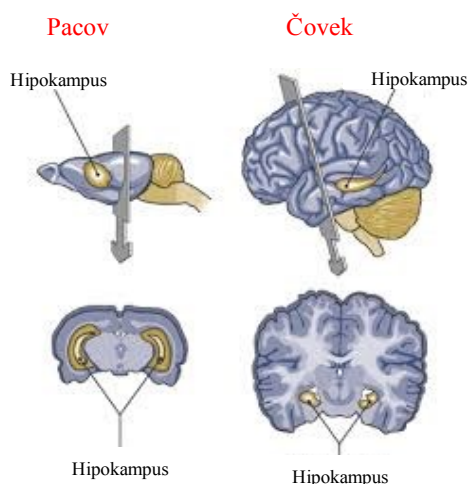
(lat. *corpus amygdaloideum*) i jedrima hipotalamusa čine limbički system (lat. *systema limbicum*) (**Slika 7**). Uloga limbičkog režanja ogleda se u formiranju emocija, prepoznavanju okruženja, obrađivanju podataka, učenju i pamćenju. Strukture limbičkog režanja ključene su u regulaciji motivacije i ponašanju uslovljenom potkrepljenjem.

Takođe, neke od ovih moždanih struktura su blisko povezane sa čulom mirisa i ukusa koji igraju važnu ulogu u preživljavanju (Svenson, 2006; Drevets, 2000). Oštećenja ovih struktura mogu dovesti do poremećaja pažnje i pamćenja, anksioznosti, psihopatoloških oboljenja, bipolarnog i afektivnog poremećaja, demencije, Alchajmerove bolesti, itd (Shaw i Alvord, 1997).

2.2.1. Hipokampusna formacija

Kod ljudi i ostalih primata, hipokampusna formacija (lat. *formatio hippocampi*) nalazi se ispod površine kore slepoočnog režnja (**Slika 8**). Sačinjena je od dorzalnog i ventralnog dela, koji imaju sličnu kompoziciju u različitim neuronskim kolima (Moser i Moser, 1998), a čine ga subikulum (lat. *subiculum*– potpora), pre- i parasubikulum, entorinalna kora (lat. *cortex entorhinalis*), zubata vijuga (lat. *gyrus dentatus*) i tri regiona pravog hipokampusa označena kao CA1, CA2 i CA3 (lat. *Cornu Ammonis*, Amonov rog).

U hipokampusu protok informacija je uglavnom jednosmeran, signalima koji se šire kroz seriju slojeva gusto napakovanih ćelija, prvo kroz zubatu vijugu, zatim kroz CA3 i CA1 sloj, subikulum potom van hipokampusa u entorinalnu oblast.



Slika 8. *Hipokampus* (www.science.com).

Svaki od ovih slojeva poseduje složena unutrašnja kola i obimne longitudinalne veze (Amaral i Lavenex, 2006).

Poznato je da hipokampus ima važnu ulogu prilikom formiranja nove epizodičke memorije (Squire i Schacter, 2002; Eichenbaum i Cohen, 2001), kao i u procesu detekcije novih događaja, mesta i stimulusa (VanElzakker i saradnici, 2003), ali i prostornoj memoriji i orijentaciji.

Oštećenja hipokampusa ne utiču na sve vrste memorije, kao što je na primer, sposobnost učenja novih motornih veština. Ozbiljna oštećenja hipokampusa uslovljavaju pojavu velikih poteškoća prilikom formiranja novih memorijskih zapisa, engrama (anterogradna amnezija) i često utiču na sećanja formirana pre oštećenja (retrogradna amnezija). Iako retrogradna amnezija dovodi do gubitka već formirane dugoročne memorije, u nekim slučajevima zadržavaju se više godina stara sećanja, što ukazuje da hipokampus nije mesto čuvanja engrama, već je uključen u proces konsolidacije memorije (Squire i Schacter, 2002).

3. Osetljivost moždanih struktura na ishemiju

Moždane strukture nisu podjednako osetljive na stanje ishemije. Struktura najosetljivija na procese ishemije, ujedno i struktura čija je neurodegeneracija najodgovornija za smanjenje kognitivnih funkcija tokom starenja i u različitim neurodegenerativnim oboljenjima je hipokampus (Farkas i saradnici, 2007; Siegel i Stewart, 1984). Primećeno je da kod pacova ishemija u trajanju od 2 minuta dovodi do pojave ishemijskih promena u subikulumu, CA1 sektoru i hilusu, dok ishemija u trajanju od 4 minuta dovodi do apoptotskih promena na neokorteksu. Kaudoputamen pokazuje najmanju osetljivost na ishemijsko stanje i tek nakon ishemije u trajanju od 10 minuta se uočava smrt ćelija. Dalje, uočeno je da je kora prednjeg mozga podložnija ishemiji od talamusa, dok je od njega manje osetljivo moždano stablo. Takođe, oštećenja se, brzo nakon nametanja stanja ishemije, mogu uočiti i u nekim regionima malog mozga, a nakon određenog vremenskog perioda i u beloj masi (Farkas i saradnici, 2007). Sa

druge strane, kičmena moždina ne mora trpeti oštećenja, čak iako je mozak znatno oštećen (Arbelaez i saradnici, 1999).

Treba istaći da je osetljivost moždanih struktura na stanje ishemije uslovljena i prisustvom različitih populacija neurona i glijskih ćelija i njihovim specifičnim metabolizmom. Neuroni su generalno osetljiviji na ishemiju u odnosu na glijske ćelije, ali su i neki neuroni više osetljivi od drugih. Tako na primer, veliku osetljivost pokazuju: piramidne ćelije CA1 regiona hipokampusa, piramidni neuroni III, V i VI sloja nove kore i Purkinje ćelije malog mozga, dok su ostale grupe neurona manje osetljive (Farkas i saradnici, 2007).

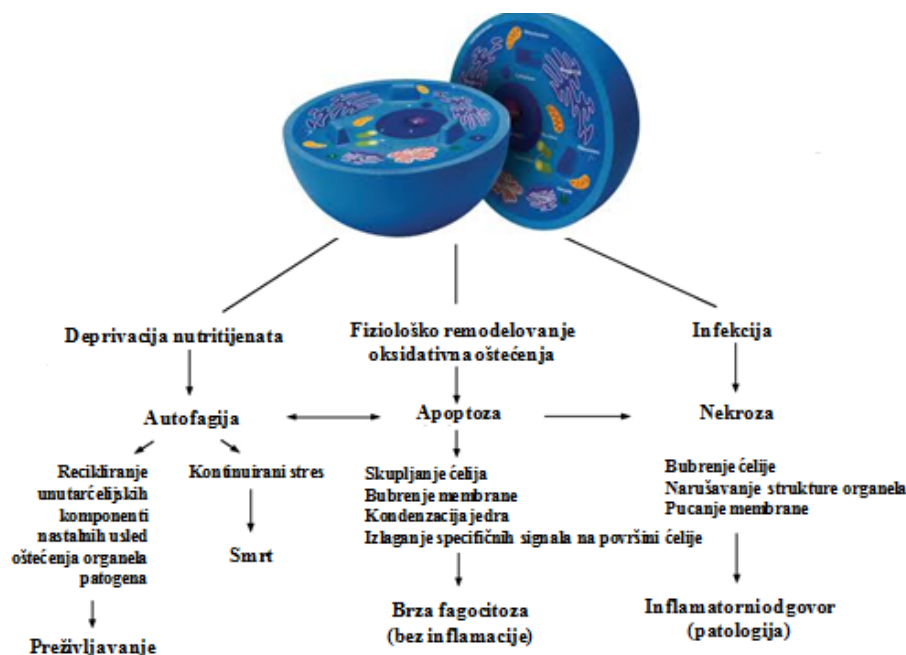
Interesantno je da se progresija neuronske povrede u toku vremena razlikuje po strukturama. Do povrede neurona prugastog tela dolazi u roku od 3 sata, dok se u hipokampusu to dešava tek nakon 48–72 sati nakon ishemije u trajanju od 5 minuta. Ova pojava je poznata kao fenomen odložene neuronske smrti (Farkas i saradnici, 2007).

4. Ćelijska smrt

Na osnovu morfoloških i biohemijskih parametara definisana su tri glavna načina umiranja ćelija (**Slika 9**): (1) **apoptoza**– tip ćelijske smrti koju karakteriše smanjivanje ćelija i kondenzacija hromatina; (2) **autofagocitoza**– tip ćelijske smrti tokom koje se formiraju specifične vakuole u umirućoj ćeliji; i (3) **nekroza**– tip ćelijske smrti tokom koje dolazi do nekontrolisanog oslobađanja unutarćelijskog sadržaja u međućelijski prostor usled naglog gubitka strukture i funkcije ćelijske membrane (Festjens i saradnici, 2006).

Programirana ćelijska smrt (eng. *programmed cell death*) je specifičan oblik tzv. ćelijskog „samoubistva” koji se javlja tokom razvića i razvoja organizma i održavanja homeostaze u nepatološkim, ali i brojnim patološkim uslovima.

Za razliku od nekrotičnih promena koje su brze i na koje je teško uticati, apoptotski procesi u mozgu prouzrokovani ishemijom mogu biti oslabljeni ili zaustavljeni (Endres i saradnici, 1998). Zbog toga su mehanizmi uključeni u regulaciju apoptoze predmet intenzivnih istraživanja koja imaju za cilj uspostavljanje novih terapijskih pristupa radi sprečavanja nastanka ili smanjenja neurodegenerativnih promena nastalih u stanjima ishemije.



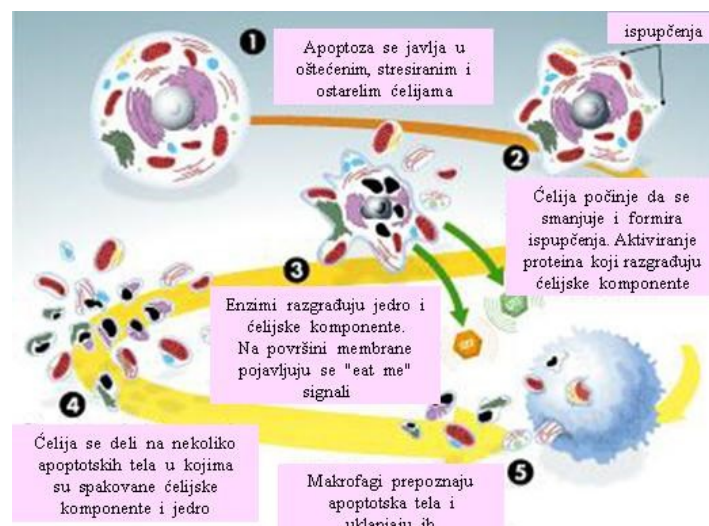
Slika 9. Shematski prikaz različitih mehanizama ćelijske smrti.

4.1. Apoptoza

Apoptoza je strogo regulisan proces koji se odigrava tokom embrionalnog razvoja, sazrevanja ćelija imunskog sistema, atrofije zavisne od hormona, formiranja veza između neurona, ali i u brojnim patofiziološkim stanjima, kao na primer autoimunskim poremećajima i neurodegenerativnim bolestima.

Tokom apoptoze dolazi do kontrolisanih specifičnih morfoloških i biohemijskih promena na osnovu kojih se ovaj proces može podeliti na ranu, srednju i kasnu fazu (Elmore, 2007) (*Slika 10*).

U ranoj fazi, ćelija gubi kontakt sa okolnim ćelijama, formiraju se specifične membranske strukture, fosfatidil-serin se premešta na površinu membrane usled narušavanja funkcije ATP-zavisne translokaze (Israels i Israels, 1999), smanjuje se volumen ćelije i citoplazma se kondenzuje usled gubitka tečnosti i jona (Hacker, 2000).



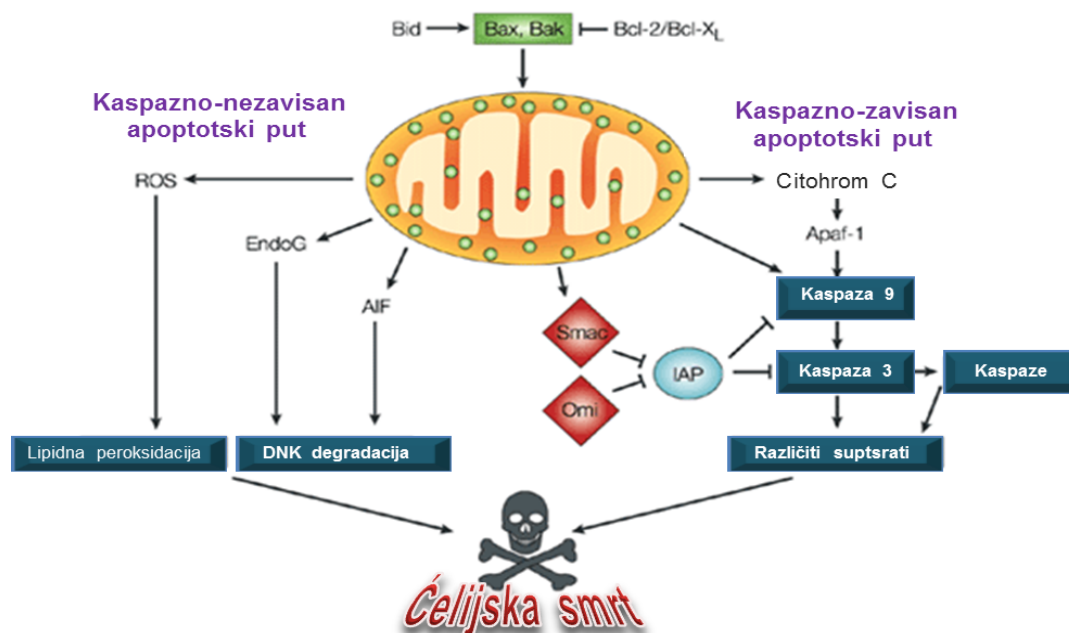
Slika 10. Morfološke promene koje se dešavaju u ćelijama tokom apoptoze (<http://science.howstuffworks.com>).

Takođe, gubi se funkcionalnost mitohondrija i smanjuje se njihov membranski potencijal. Srednju fazu karakteriše pupljenje membrane i aktivacija proteina iz porodice cistein-aspartat proteaza, odnosno, kaspaza (eng. *cysteine aspartyl-specific proteases*), što dalje omogućava razgradnju elemenata citoskeleta, enzima i drugih proteina. Aktivacijom kaspaza dolazi do proteolize lamina, kondenzacije hromatina (piknoze), formiranja mase hromatina na jedarnoj membrani i specifične fragmentacije DNK (Nagata i saradnici, 2003). Finalnu fazu prati konačna degradacija ćelijske membrane, citoplazme i jedra. Formiraju se apoptotska tela, strukture kondenzovane citoplazme sa gusto napakovanim organelama obavijene ćelijskom membranom, koja bivaju uklonjena fagocitozom od strane prisutnih makrofaga.

4.2. Pokretanje apoptotske kaskade

Apoptotska signalizacija, koja se pokreće u prisustvu specifičnih stimulusa (Corcoran i saradnici, 1994) može se javiti usled aktivacije dva konvergirajuća puta: ekstrinzičkim ili spoljašnjim putem, preko receptora smrti i intrinstičkim ili unutrašnjim putem, posredovanim članovima Bcl-2 familije (Marsden i Strasser, 2003). U većini slučajeva, u oba puta se aktiviraju proteolitički enzimi, članovi familije kaspaza (Kohler i saradnici, 2002).

Postoje podaci da se apoptoza može javiti i nezavisno od aktivacije kaspaza, odnosno kaspazno-nezavisnim putem. Uočeno je da ROS i nekoliko proteina, poput endonukleaze G (EndoG) i AIF-a (eng. *apoptosis inducing factor*) učestvuju u ovom putu (Donovan i Cotter, 2004) (**Slika 11**).



Slika 11. Kaspazno-nezavisni i kaspazno-zavisni apoptotski putevi.

4.2.1. Spoljašnji put apoptoze

Spoljašnji signalni put pokretanja apoptoze uključuje interakcije posredovane transmembranskim receptorima. Prvi u ovom signalnom putu su receptori smrti (eng. *death receptors*, DR) iz nadporodice TNF (Locksley i saradnici, 2001), koji poseduju domene smrti (eng. *death domains*, DD) i imaju centralnu ulogu u prenosu signala sa površine ćelije i aktiviranju unutarćelijskih signalnih puteva (**Slika 12**).

Sled događaja koji se odvijaju tokom aktivacije spoljašnjeg puta apoptoze najbolje su opisani za receptor TNF-6 (FasR) i receptor TNF-1 (TNFR-1). Prvi korak podrazumeva grupisanje receptora na ćelijskoj membrani i formiranje homotrimerera. Nakon vezivanja odgovarajućeg liganda za receptore, adapterski proteini se premeštaju iz citoplazme i vezuju za DR. Tako, se za FasR vezuje specifičan protein pridružen FasR (eng. *Fas-Associated protein with Death Domain*, FADD), dok se za TNFR-1 vezuje protein pridružen TNFR-1 (eng. *TNF receptor type 1-associated death domain protein*, TRADD) koji regrutuje FADD i odgovarajući receptorski integrišući protein (eng. *receptor integrating protein*, RIP) (Hsu i saradnici, 1996; Wajant i saradnici, 2001). FADD odnosno TRADD se potom dimerizuju i stupaju u interakciju sa prokaspazom 8. Na ovaj način se formira signalni kompleks smrti (eng. *death inducing signaling complex*, DISC) koji omogućava auto-katalitičku aktivaciju prokaspaze 8 (Kischkel i

saradnici, 1995) i početak egzekucione faze apoptoze koja je praćena aktivacijom/inaktivacijom brojnih gena i proteina (Boatright i saradnici, 2003).

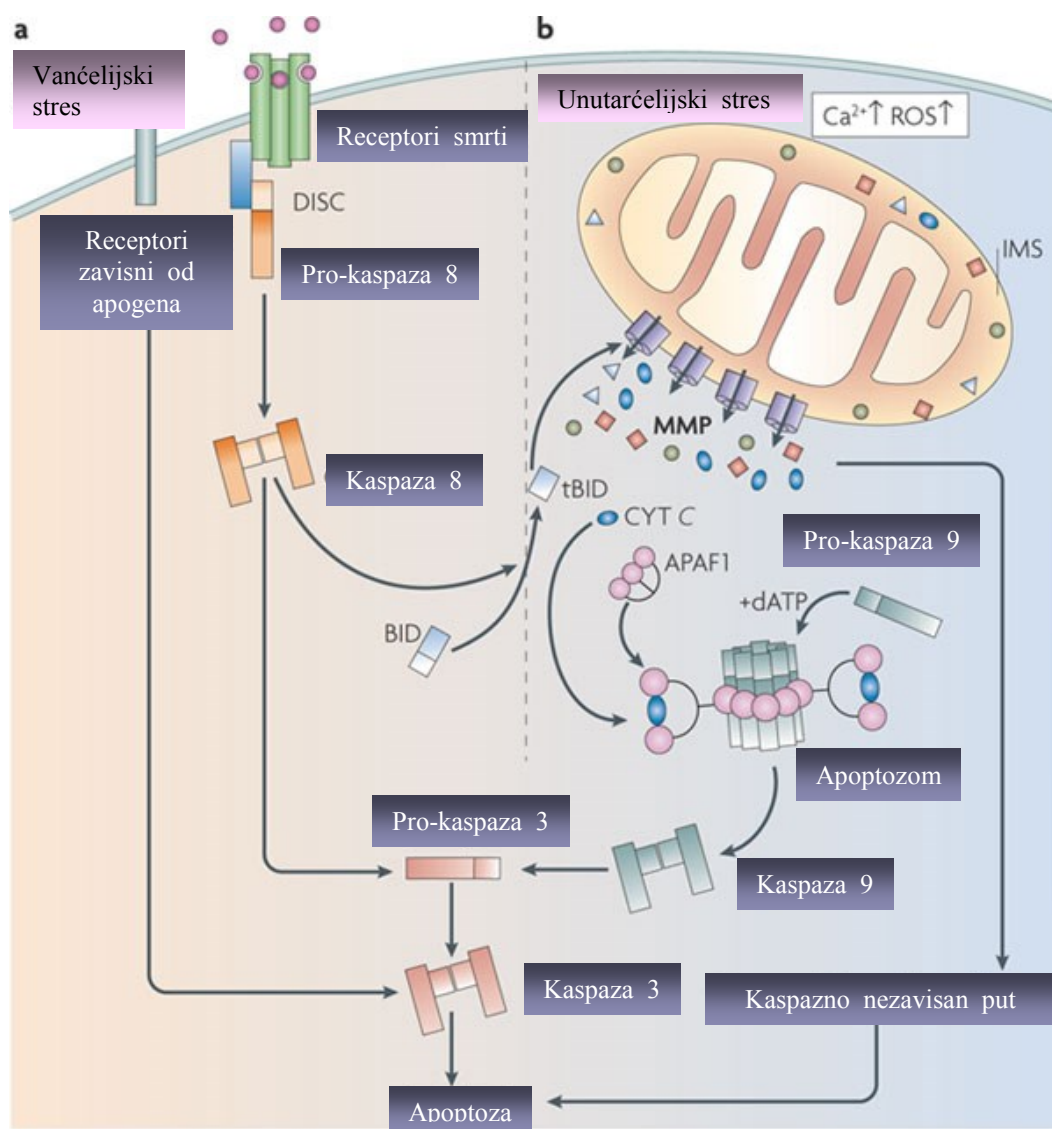
4.2.2. Unutrašnji put apoptoze

Unutrašnji, mitohondrijski put može biti pokrenut različitim stimulusima, poput radijacije, toksina, hipoksije, hipertermije, viralne infekcije, slobodnih radikala, kao i gubitka faktora koji sprečavaju procese apoptoze (faktori rasta, hormoni i citokini) (Marsden i Strasser, 2003). Svi navedeni signali uzrokuju promene u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, depolarizaciju membrane mitohondrija, formiranje pora i oslobađanje dve grupe pro-apoptotskih proteina u citoplazmu ćelije (Saelens i saradnici, 2004) (*Slika 12*).

Prvu grupu proteina čine citohrom C (CytC), SMAC (eng. *second mitochondria-derived activator of caspases*) i serinska proteaza HtrA2 (Garrido i saradnici, 2006; Du i saradnici, 2000). Poznato je da se oslobođeni CytC u citoplazmi vezuje i aktivira APAF-1 (eng. *apoptotic protease activating factor 1*) i prokaspazu 9, formirajući apoptozom (Hill i saradnici, 2004). Kompleks kaspaza 9/apoptozom dalje aktivira efektorsku kaspazu 3, što se u apoptotskoj kaskadi smatra „tačkom bez povratka“ (Marsden i saradnici, 2004).

Sa druge strane, SMAC i HtrA2 podstiču apoptozu aktiviranjem kaspazno-nezavisnog mehanizma, tako što:

- 1) smanjuju i sprečavaju aktivnost proteina IAP (eng. *inhibitors of apoptosis*) (Schimmer, 2004);
- 2) podstiču oslobađanje proteina druge grupe, poput AIF, EndoG i CAD (eng. *caspase activated Dnase*) što je karakteristično za kasnu fazu apoptoze. AIF se premešta u jedro, izaziva fragmentaciju DNK i kondenzaciju perifernog jedarnog hromatina (Joz a i saradnici, 2001). EndoG, takođe, odlazi u jedro i isecanjem DNK omogućava stvaranje oligonukleozomalnih fragmenata DNK. AIF i EndoG obavljaju svoju funkciju nezavisno od kaspaza, dok CAD nakon aktivacije od strane kaspaze 3 seče DNK i učestvuje u dodatnoj kondenzaciji hromatina (Enari i saradnici, 1998).



Slika 12. Pokretanje apoptoze, spoljašnji i unutrašnji putevi (www.nature.com).

Unutrašnji put se još naziva i „Bcl-2 kontrolisani put“ (eng. *Bcl-2 controlled pathway*), jer se njegova regulacija odvija posredstvom članova Bcl-2 proteina (Cory i Adams, 2002) koji kontrolišu permeabilnost mitohondrijske membrane. U prisustvu pro-apoptotskih stimulusa, proteini Bcl-2 porodice menjanjem propustljivosti membrane omogućavaju oslobađanje CytC, formiranje apoptozoma i širenje apoptotskog signala.

4.2.2.1. Proteini unutrašnjeg puta apoptoze

Bcl-2 familija proteina

Porodica Bcl-2 proteina je evolutivno dobro očuvana i relativno velika. Svi članovi Bcl-2 porodice imaju jedan ili više konzerviranih domena tzv. Bcl-2 homolognih domena (BH1–4), koji su neophodni za heterodimernu interakciju sa drugim proteinima ove porodice (Danial i Korsmeyer, 2004). Neki proteini poseduju i hidrofobni domen na

C-kraju, koji omogućava pozicioniranje molekula na/u mitohondrijalnu membranu (Korsmeyer, 1999). Na osnovu različitih strukturnih i funkcijskih karakteristika, članovi ove porodice mogu se podeliti na anti- i pro-apoptotske proteine (Donovan i Cotter, 2004; Petros i saradnici, 2004).

- 1) Anti-apoptotski proteini su: Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*), Bcl-xl (eng. *Bcl-extra long*), A1 (eng. *Bcl-2-related protein A1*), Bcl-w (eng. *Bcl-2-like protein 2*), Boo (eng. *Bcl-2 homolog of ovary*) i ostali proteini sa sva četiri BH domena. Bcl-2 i Bcl-xl imaju i hidrofobni transmembranski domen sa C-terminalnom grupom, koja olakšava premeštanje proteina iz citoplazme prvenstveno u spoljašnju mitohondrijalnu membranu. Tako se Bcl-2, u stanju mirovanja, nalazi u jedarnoj i membrani endoplazminog retikuluma, a nakon stimulusa se premešta i ugrađuje u spoljašnju mitohondrijsku membranu. U ovu podgrupu spada i Mcl-1 (faktor-1 leukemije mijeloidne ćelije), koji je jedini apoptotički Bcl-2 protein sa tri BH domena (BH 1–3).
- 2) Pro-apoptotski proteini se prema broju BH domena mogu podeliti u dve podgrupe: efektorske proteine i BH-3-only proteine. Efektorski proteini, Bax (eng. *Bcl-2 associated X protein*) i Bak (eng. *Bcl-2 antagonistic killer*), izazivaju permeabilizaciju mitohondrijske membrane formiranjem pora. Grupi BH-3-only proteina ili „stražara” (eng. *sentinels*) pripada osam proteina koji sadrže samo BH3 domen sa izuzetkom, Bcl-xs (eng. *Bcl-extra short*), koji sadrži i BH4 domen. Najpoznatiji su Bid (eng. *Bcl-2 interacting domain death agonist*), Bim (eng. *Bcl-2 interacting mediator of cell death*) i Bad (eng. *Bcl-2 antagonist of cell death*), koji se nalaze u citoplazmi mitohondrija. U neaktivnoj ćeliji, ovi proteini su inaktivirani, a nakon stimulusa neophodni su za aktivaciju pro-apoptotskih članova.

Mnoge studije ukazuju da je apoptoza regulisana odnosom pro- i anti-apoptotskih proteina Bcl-2 familije i da taj odnos predstavlja prekidač za uključivanje i isključivanje apoptotskih procesa (Donovan i Cotter, 2004). Nakon primanja stimulusa, proteini sa samo BH3 domenom, odnosno domenom minimalnog odumiranja, mogu neutralizovati ili suzbiti dejstvo anti-apoptotskih Bcl-2 molekula i omogućiti pro-apoptotskim proteinima, poput Bax i Bak, da pokrenu apoptotsku kaskadu (Wang i saradnici, 1996). S druge strane, anti-apoptotski proteini ove porodice, kao što je Bcl-2, stupaju u interakciju sa Bak-om i Bax-om i inhibiraju njihovu oligomerizaciju i/ili se vezuju za proteine samo sa BH3 domenom i na taj način sprečavaju apoptozu (Motoyama i

saradnici, 1995). Ovakav način uzajamne regulacije leži u osnovi činjenice da odnos njihovih relativnih koncentracija delom određuje podložnost ćelije signalima smrti i predstavlja tzv. reostat programa „samoubistva” (Donovan i Cotter, 2004).

Kaspaze

Kaspaze, proteolitički enzimi, imaju centralnu ulogu u procesima apoptoze, nekroze i inflamacije (Gorman i saradnici, 1998), ali i drugim ćelijskim procesima, uključujući i progresiju ćelijskog ciklusa i preživljavanje ćelija (Alenzi i saradnici, 2010).

U skoro svim ćelijama, kaspaze se eksprimiraju na konstitutivan način, ali i delovanjem proteina IAP, koji direktno inhibiraju aktivaciju kaspaza 8 i 9, i indirektno kaspaze 3 i 7, prisutne su kao neaktivni pro-enzimi (zimogeni) (Miller, 1999). Nakon odgovarajućeg stimulusa, kaspaze sazrevaju procesom proteolitičke degradacije kojim se odvajaju velika i mala subjedinica, pri čemu se prodomen auto-katalitički uklanja. Do aktivacije kaspaza dolazi nakon udruživanja male i velike subjedinice i formiranja heterodimera koji ima katalitičku aktivnost, kao i mesta za vezivanje supstrata (Gupta, 2000a,b; Nicholson i Thornberrz, 1997). Aktivne kaspaze imaju vrlo čvrstu, dimernu strukturu koja nastaje usled vezivanja dve identične katalitičke subjedinice.

Kod sisara je otkriveno 14 kaspaza (Deveraux i saradnici, 1999), koje se međusobno razlikuju na osnovu funkcije, strukture i specifičnosti prema supstratu i mogu se grubo klasifikovati u tri grupe:

- ◆ Grupa I ili inflamatorne kaspaze (kaspaza 1, 4, 5, 12) poseduju CARD ili domen aktivacije kaspaze (eng. *caspase activating and recruitment domain*) na N-kraju. Pretežno seku supstrate iza specifične sekvence XEHD (X- hidrofobni ostatak, E- glutamatska kiselina, H- histidin i D- aspartatska kiselina) (Thornberrz, 1997);
- ◆ Grupa II ili efektorske kaspaze (kaspaza 3, 6, 7) prepoznaju tetrapeptid DEXD (D- aspartatska kiselina, E- glutamatska kiselina, X- hidrofobni ostatak i D- aspartatska kiselina) i odgovorne su za razlaganje ćelijskih komponenti, poput citokeratina, citoskeletnog proteina α -fodrina, jedarnog NuMa (eng. *Nuclear Mitotic Apparatus protein*), PARP (eng. *poly*-(ADP-ribose) polymerase) i dr (Elmore, 2007). Zimogen kaspaze 3 je protein molekulske mase od 32 kDa koji se nakon apoptotskog signala seče na dve subjedinice od 17 kDa i 12 kDa. Po dve subjedinice od 17 kDa i dve subjedinice od 12 kDa obrazuju heterotetramere

koji predstavljaju aktiviranu kaspazu 3. Katalitičko mesto kaspaze 3 obuhvata sulfhidrilna grupa koja stabilizuje ključne aspartatne ostatke i imidazolski prsten koji nakon prepoznavanja, seče peptidnu vezu. Aktivirana kaspaza 3 specifično prepoznaje tetra-peptidne sekvence na supstratima i hidrolizuje peptidne veze iza Asp-X-X-Asp motiva;

- ♦ Grupu III ili inicijatorne kaspaze (kaspaza 2, 8, 9, 10) karakteriše prisustvo CARD ili DED (eng. *death effector domain*) domena na N-kraju. Kaspaze ove grupe specifično prepoznaju sekvencu BEXD (B- aminokiselina razgranatog lanca (eng. *branched-chain amino acid*) valin, leucin ili izoleucin, E- glutamatska kiselina, X- hidrofobni ostatak i D- aspartatska kiselina) kod efektorskih kaspaza i drugih supstrata i hidrolizuju peptidnu vezu.

Do sada je identifikovan veliki broj specifičnih supstrata čijim proteolitičkim sečenjem, kaspaze kontrolišu ćelijski ciklus, popravku oštećene DNK, apoptozu (Zlender, 2003).

PARP

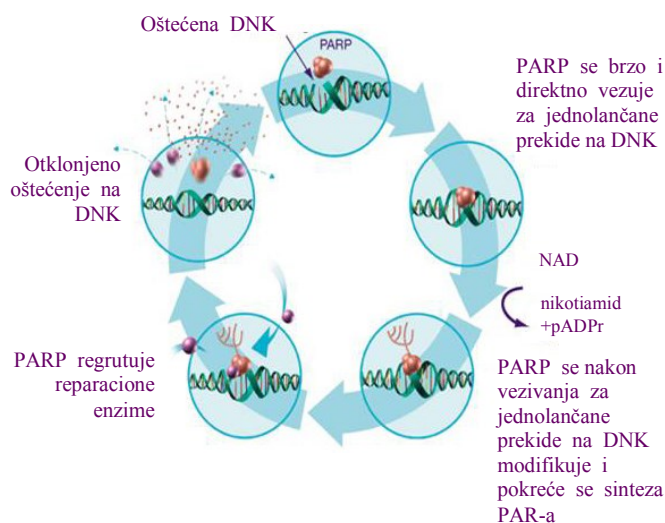
PARP proteini su članovi velike porodice enzima koji koriste NAD^+ kao supstrat za prenošenje ADP-riboze na glutamatne ostatke proteina (Ueda i Hayaishi, 1985) i time ostvaruju svoju ulogu u procesima reparacije i programirane ćelijske smrti.

Prenoseći veći broj molekula na protein primalac, PARP proteini omogućuju stvaranje poli-(ADP-riboze) (PAR), lanaca koji mogu biti dugi i preko 100 molekula ADP-riboze, linearni i/ili višestruko razgranati. Usled dodavanja ovih negativno naelektrisanih polimera dolazi do promene elektrostatičkih karakteristika proteina koji trpi modifikaciju.

Primarnu strukturu PARP proteina čine: (1) DNK vezujući domen na N-kraju sa dva Zn^{2+} prstića, odgovoran za vezivanje za DNK molekul i konformacione promene; (2) domen auto-modifikacije neophodan za oslobađanje DNK nakon katalize i inaktivaciju izazvanu sečenjem; (3) domen sa mestom za proteolitičko sečenje kaspazama; i (4) katalitički domen na C-kraju bitan za procese polimerizacije (Smith, 2001).

U normalnim uslovima, katalitički neaktivan PARP se nalazi u jedru. Usled narušavanja strukture DNK lanca i nastanka specifičnih jednolančanih fragmenata (koji se javljaju usled metaboličkih, hemijskih ili fizičkih procesa) pokreće se sinteza PAR. *In vitro* studije pokazuju da se PARP čvrsto vezuje za prekinutu DNK, pri čemu dolazi do

aktivacije katalitičkog domena i poli-(ADP-ribozil)-acije samog PARP (*Slika 13*). Formiranje PAR lanaca predstavlja signal za različite DNK reparacione enzime (DNK ligaze III, DNK polimeraze- β) i „proteine skele” (eng. *scaffold proteins*).



Slika 13. Popravlak oštećenja na DNK molekulu pomoću PARP (Cacciatore, 2010).

Treba istaći da, tokom formiranja PAR i reparacije DNK, PARP troši velike količine ATP, što može izazvati lizu i smrt ćelije. Takođe, uočeno je da povećano stvaranje PAR, stimulisanjem oslobađanja AIF iz mitohondrija, može dovesti i do aktiviranja apoptotskih signalnih putava nezavisnih od kaspaza (Smith, 2001).

PARP (tzv. PARP-1), je prvo otkriveni i najprisutniji član ove familije proteina (D'Amours i saradnici, 1999). Inače, to je prvi protein koji je identifikovan kao supstrat za kaspaze 3 i 7. Tokom apoptoze, kaspaza 3 seče PARP na Asp²¹⁴ i Gly²¹⁵, čime nastaju dve neaktivne subjedinice različitih molekulskih masa: 89 kDa koja sadrži auto-modifikacioni i katalitički domen, kao i manja subjedinica od 24 kDa sa DNK-vezujućim domenom.

Citohrom C

CytC, visoko konzervirani protein veličine 13 kDa, nakon sinteze u citoplazmi ulazi u mitohondrije i vezuje se za kardiolipin koji se nalazi na unutrašnjoj membrani mitohondrija (Pellegrini i Scorrano, 2007). Ima ključnu ulogu u procesima oksidativne fosforilacije i apoptoze. Izgrađen je od jednog dugog polipeptidnog lanca (104 aminokiseline) sa 5 α -heliksa i jedne hem grupe, sa Fe²⁺ ili Fe³⁺ vezanim na Cys¹⁴ i Cys¹⁷, koja omogućava prenošenje elektrona.

Nakon popravke DNK, novonastala auto-modifikacija oslobađa PARP od DNK, zbog elektrostatičkog odbijanja negativno naelektrisanih polimera i PAR lanci se uklanjaju enzimom poli-(ADP-ribozo)-glikohidrolazom (PARG).

U apoptotskim uslovima, pripadnici Bcl-2 porodice, Bax i Bak, formiraju pore na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Ovaj Ca^{2+} -zavisni proces omogućava oslobađanje CytC iz intermembranskog prostora mitohondrija u citoplazmu (Polster i Fiskum, 2004) i dovodi do njegove interakcije sa receptorom za inozitol-3-fosfat (IP3), koji je zapravo kanal za Ca^{2+} lociran na spoljašnjoj membrani endoplazminog retikuluma.

CytC, učestvuje i u spoljašnjem putu apoptoze kao komponenta kompleksa APAF, čime se formira već pomenuti apoptozom koji regrutuje i aktivira pro-kaspazu 9. Aktivirana kaspaza 9 dovodi do aktivacije efektorskih kaspaza 3 i 7, i na kraju do apoptoze. Dalje, CytC-posredovano oslobađanje Ca^{2+} iz endoplazminog retikuluma doprinosi pokretanju procesa apoptoze, budući da su aktivacije kaspaze 9 i 3, Ca^{2+} zavisni mehanizmi (Polster i Fiskum, 2004).

5. Estrogeni

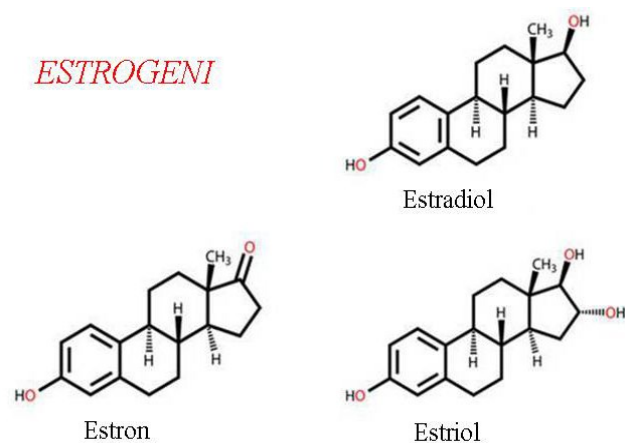
Polni hormoni nastaju u gonadama, nadbubrežnim žlezdama, mozgu i jetri. Utiču na razvoj reproduktivnih puteva, primarnih i sekundarnih polnih karakteristika kod svih kičmenjaka, uključujući i ljude (Panzica i Melcangi, 2008). Njihova uloga u reproduktivnim procesima se prevashodno ostvaruje preko regulacije procesa polnog razvoja i sazrevanja, ali i polno-zavisnog organizovanja mozga i ponašanja (Carreau i saradnici, 2008).

Nakon nastanka i lučenja, polni hormoni se oslobađaju u krvotok gde se uglavnom vezuju za posebne transportne proteine, kao što je globulin koji vezuje polne hormone (eng. *sex steroid-binding globulin*) i tako se prenose do ciljnih tkiva. S obzirom na to da su mali liposolubilni molekuli, mogu neometano proći kroz ćelijsku membranu i svoje efekte ostvarivati na dva načina: genomski i negenomski. Naime, svi polni hormoni se vezuju za specifične unutarćelijske receptore (ER) koji su u osnovi, transkripcioni faktori, koji ostvaruju pozitivan i negativan uticaj na ekspresiju ciljnih gena (Beato i Klug, 2000; Beato i saradnici, 1996a,b). Međutim, efekti ovih hormona mogu biti posredovani i negenomskim mehanizmom, što se ostvaruje putem aktivacije brojnih membranskih vezujućih mesta, ali i receptora u citoplazmi. Ove akcije posledično podrazumevaju aktivaciju signalnih puteva posredovanih guanozin nukleotid-vezujućim proteinom (protein G), fosfolipazom C, IP3, unutarćelijskim Ca^{2+} i protein kinazom C (Sylvia i saradnici, 2001; Civitelli i saradnici, 1990).

Polni hormoni obuhvataju androgene, progestogene i estrogene. Androgeni su primarno muški polni hormoni koji stimulišu ili/i kontrolišu razvoj i održavanje muških polnih karakteristika. Progestogeni su odgovorni za održavanje menstrualnog ciklusa, trudnoće i embriogenezu. Estrogeni prevashodno učestvuju u regulaciji reproduktivne funkcije, ali i radu imunskog, skeletnog, kardiovaskularnog i nervnog sistema, kao i regulisanju metabolizma i održavanju homeostaze jona i vode.

Estrogene proizvode svi kičmenjaci, kao i neki insekti što ukazuje na njihovu veliku evolutivnu očuvanost (Ryan, 1982). Najveća količina estrogena proizvodi se u razvijajućem folikulu jajnika, žutom telu i posteljici, testisima, a u manjim količinama u jetri, nadbubrežnim žlezdama i mozgu. Kao i ostali steroidni hormoni, estrogeni nastaju enzimskom obradom holesterola u procesu steroidogeneze koju čine koraci dehidrogenacije i aromatizacije.

U kontroli sinteze i lučenja estrogena iz granuloznih ćelija folikula jajnika i drugih tkiva, uključeni su hormoni sintetisani u hipotalamusu, poput gonadotropno-oslobađajućeg hormona (GnRH), kao i hormoni hipofize, gonadotropini. Poznato je da ovi polni hormoni (zajedno sa progesteronom) sprečavaju oslobađanje hormona hipofize, FSH (foliko-stimulirajući hormon) i LH (lutenizirajući hormon), mehanizmom negativne povratne sprege i stimulišu oslobađanje GnRH iz hipotalamusa.



Slika 14. Prikaz hemijske strukture estrogena.

Do danas su identifikovane tri glavne vrste estrogena koje se međusobno razlikuju po broju hidroksilnih grupa u svojoj molekularnoj strukturi (**Slika 14**): estron, estradiol (17 β -estradiol, E) i estriol. Kod žena u reproduktivnom periodu najvažniji hormon je estradiol koji nastaje iz testosterona i estrona, tokom trudnoće estriol koji nastaje iz estrona i estradiola, dok nakon menopauze tu ulogu preuzima estron poreklom iz androstenediona.

Poznato je da estradiol smanjuje intenzitet inflamatornih procesa u mozgu i disfunkciju krvno-moždane barijere (Shichita i saradnici, 2012), pojačava moždanu cirkulaciju

(Pelligrino i saradnici, 1998) i sposobnost neurona da prenose signale, stimuliše sinaptičku plastičnost, kognitivne funkcije i dr (Sherwin, 2007). Estradiol sprečava apoptotske procese pokrenute na nivou mitohondrija, tako što stabilise potencijal mitohondrijske membrane, smanjuje trošenje ATP i stvaranje ROS (Mattson, 2006; Wang, 2001).

6. Estradiol i ishemija mozga

Prvobitno se smatralo da estrogeni svoje efekte ostvaruju isključivo dejstvom na reproduktivne organe, hipotalamus i ostale regione mozga uključene u regulaciju reproduktivne funkcije. Međutim, pokazano je da oni mogu imati efekat i na druge delove mozga, kao npr dopaminski sistem srednjeg mozga, serotoniniski sistem i kateholaminski sistem moždanog stabla, acetilholinski sistem bazalnog prednjeg mozga, kičmenu moždinu i dr (McEwen, 2002).

Podaci o efektima tretmana estradiolom u uslovima moždane ishemije ukazuju da ovaj hormon može ispoljiti, kako pozitivan, tako i negativan uticaj na preživljavanje ćelija, sinaptičku plastičnost i kognitivne funkcije (Schreihöfer i Ma, 2013). Glavni faktori koji to određuju su: vreme, količina (jačina doze) i učestalost aplikacije (Petito i saradnici, 1987), ali i tip nametnute ishemije, kao i soj, pol, uzrast pacova i trenutno hormonsko i zdrastveno stanje jedinke (Strom i saradnici, 2011).

Postoje jasni dokazi da ovaj izrazito potentni polni hormon ima značajnu neuroprotektivnu ulogu u eksperimentalnim modelima globalne i fokalne ishemije (Petito i saradnici, 1987). Primećeno je da terapija fiziološkim dozama estradiola dve nedelje pre ishemije, sprečava smrt neurona u CA1 regionu hipokampusa i umanjuje kognitivni deficit posredovan ishemijom (Lebesgue i saradnici, 2009). Sa druge strane, pretretman niskom dozom estradiola i njegova aplikacija odmah nakon ishemije, umanjuje oštećenja vizuelne radne memorije, kognitivnih funkcija i CA1 neurona koja nastaju u uslovima globalne ishemije (Guinello i saradnici, 2006). Takođe, uočeno je da tretman farmakološkim dozama ovog hormona nakon ishemije, smanjuje odumiranje ćelija i obim nastalih lezija. Tako, npr, pojedinačna farmakološka doza, aplicirana direktno u epiduralni prostor odmah nakon ishemijskog događaja smanjuje odumiranje neurona, kao i smanjenje kognitivnih sposobnosti (Lebesgue i saradnici, 2009).

Pomenuti neuroprotektivni efekat, može se ostvariti pokretanjem genomskih i negenomskih mehanizama. Aktiviranje ovih mehanizama u stanju moždane hipoperfuzije doprinosi pokretanju blažeg inflamatornog odgovora, smanjenju obima apoptoze i oksidativnog stresa (Strom i saradnici, 2013). Brojne studije ukazuju da estradiol podstiče ćelijsko preživljavanje u uslovima moždane ishemije, time što reguliše nivo Ca^{2+} , aktivaciju mitogenom-aktiviranih protein kinaza (MAPK) i protein kinaze B (Akt), kao i signalnih puteva različitih proteina G, fosfolipaze C, protein kinaze C i IP3 (Cardona-Gómez i saradnici, 2003; Filardo i saradnici, 2000; Singh i saradnici, 2000), ali i da stimuliše ekspresiju i aktivnost neurotrofina i njihovih receptora, faktora rasta koji su neophodni za sinaptogenezu (Wise i Dubal, 2000), kao i različitih anti- i pro-apoptotskih proteina uključujući i pripadnike Bcl-2 familije (Dubal i saradnici, 1999).

Sa druge strane, uočeno je da estradiol može ispoljiti i negativne, odnosno neurotoksične efekte i doprineti povećanju ishemičnog oštećenja (Strom i saradnici, 2013) i smanjenju kognitivnih funkcija, time što smanjuje proliferaciju i povećava broj apoptotskih ćelija (Schreihöfer i Ma, 2013). Rezultati brojnih *in vivo* i *in vitro* studija ukazuju na nekoliko mehanizama kojima estradiol može dovesti do ispoljavanja ovih efekata, poput povećanja pro-inflamatornog odgovora (Yong i saradnici, 2005; Carswell i saradnici, 2000), ekscitotoksičnosti (Strom i saradnici, 2011) i oksidativnog stresa (Gordon i saradnici, 2005).

* * *

U ishemijskim bolestima mozga uobičajena je pojava vremenski-zavisnog pogoršanja kognitivnih funkcija, uključujući uobičajeno smanjenje sposobnosti učenja i memorije koji nastaju usled odumiranja ćelija. Međutim, iako se ove bolesti intenzivno proučavaju, o vremenski-zavisnim mehanizmima njihovog nastanka malo se zna.

Među ženskim polnim hormonima, estradiol, ispoljava veliki neuroprotektivni potencijal i zbog toga mehanizmi njegovog delovanja, kao i terapijska uloga u brojnim neurodegenerativnim poremećajima, poslednjih 20 godina predstavljaju predmet intenzivnih proučavanja mnogih studija.

Sa obzirom na oskudnost rezultata o vremenski-zavisnom odgovoru nervnih ćelija u uslovima nametnute trajne globalne ishemije, kao i efektima estradiola na ekspresiju

apoptotskih molekula u stanju hronične moždane hipoperfuzije, proučavanje pomenutih parametara kako u osnovnim, tako i u prekliničkim i kliničkim studijama predstavlja novo i interesantno polje istraživanja.

CILJ RADA

Neuroni u centralnom nervnom sistemu, masivno odumiru u stanjima koja prate akutne povrede, poput moždanog udara, kratkotrajnog prestanka rada srca i trauma, ali i tokom progresivnih neurodegenerativnih bolesti koje se najčešće javljaju u starosti (Austin i saradnici, 2010; Borghammer i saradnici, 2010a,b). Upravo je moždana hipoperfuzija stanje karakteristično za procese starenja i različita oboljenja, kao što su neki tipovi demencije, Alchajmerova i Parkinsonova bolesti (Farkas i saradnici, 2007). Tokom prvih nekoliko dana nametnute hipoperfuzije uočava se značajno smanjenje protoka krvi kroz mozak, što uzrokuje različit stepen oštećenja moždanih struktura. Naime, primećeno je da kora prednjeg mozga i hipokampus podležu izrazitim oštećenjima, što za posledicu može imati različite neurološke deficite, uključujući i smanjenje kognitivnih funkcija (Farkas i saradnici, 2007; Driscoll i saradnici, 2005), dok druge moždane strukture pokazuju manju osetljivost i stepen oštećenja (Farkas i saradnici, 2007).

Brojne studije ukazuju da estradiol može regulisati sinaptičku plastičnost, sprečiti apoptozu, povećati vijabilnost ćelija i njihovu proliferaciju u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Sa druge strane, kod pacova ali i kod ljudi, primećeno je da ovaj potentni polni hormon uslovljava pojavu niza nuspojava naročito kod pripadnika muškog pola, poput oštećenja jetre, kardiovaskularnog sistema, ginektomastije, atrofije testisa, ali i depresije i agresivnog ponašanja.

Imajući u vidu oskudnost informacija o vremenski-zavisnom odgovoru nervnih ćelija u stanju moždane hipoperfuzije, **osnovni cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita efekat hroničnog tretmana estradiolom na apoptotske puteve u nervnim ćelijama moždane kore i hipokampusu polno zrelih mužjaka pacova Wistar soja u stanju nametnute hronične moždane hipoperfuzije. Tome je predhodilo proučavanje efekta moždane hipoperfuzije na složenu kaskadu apoptotskih signalnih puteva u kori prednjeg mozga i hipokampusu pacova u različitim vremenskim tačkama.**

U skladu sa zadatim ciljem izučavani su sledeći parametri:

1. Step en apoptotske smrti, primenom fragmentacionog DNK eseja i *Fluoro-Jade B* bojenja u zavisnosti od vremena proteklog od operacije u kori prednjeg mozga i hipokampusu lažno-operisanih pacova, koje su poslužile kao kontrola i kod životinja podvrgnutih obostranim okluzijama bilateralnih vertebralnih arterija;

2. Vremenski-zavisni efekti moždane hipoperfuzije na ekspresiju pojedinih apoptotskih proteina u neprečišćenim membranskim frakcijama izolovanim iz kore prednjeg mozga i hipokampusa;
3. Uticaj estradiola na nivo i obim ćelijske smrti, praćenjem:
 - a. Nivoa fragmentacije DNK u prečeojoj kori i hipokampusu;
 - b. Broja apoptotskih ćelija pomoću *Fluoro-Jade B* bojenja preseka prečeoone kore i hipokampusa;
 - c. Nivoa genske i proteinske ekspresije signalnih molekula uključenih u apoptotske puteve, kao što su Bcl-2 i Bax u prečeojoj kori i hipokampusu;
 - d. Nivoa ekspresije pro-apoptotskih enzima– citohrom c, prokaspaza 3, sečena kaspaza 3 i PARP u različitim subćelijskim frakcijama prečeoone kore i hipokampusa.

Podaci o promeni ekspresije iRNK i proteina, njihovoj aktivnosti, kao i o subćelijskoj distribuciji izabranih apoptotskih molekula upotpuniće sliku o uticaju moždane hipoperfuzije na oštećenje neurona izabranih regiona. Budući da je trend savremenih istraživanja u ovoj oblasti otkriće potencijalnih neuroprotektora, neophodno je istražiti puteve kojima moždana hipoperfuzija dovodi do nastanka i razvoja neuronske povrede, a hroničan tretman estradiolom do njenog smanjenja ili otklanjanja.

MATERIJALI I METODE

1. Materijali

U ovom radu su korišćene hemikalije p.a. stepena čistoće.

Od firme SERVA, Heidelberg, Nemačka, nabavljeni su: Tris baza, glicin, spermin, spermidin, aprotinin, antipain, leupeptin, dietilpirokarbonat (DEPC), agaroza, TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin).

Od firme Sigma Chemical Company, St. Louis, SAD, nabavljene su sledeće hemikalije: goveđi serumski albumin (BSA), natrijum-dodecil sulfat (SDS), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), Tween-20, saharoza, natrijum fluorid, β -merkaptotanol, ditiotreitol (DTT), etilendiamino-tetrasirćetna kiselina (EDTA), etilen-glicerol tetrasirćetna kiselina (EGTA), akrilamid, folin, DePeX i estradiol (E).

Boja *Fluoro-Jade B* proizvod je firme Chemicon International Inc, SAD; *Hoechst 33258* proizvod je firme Acros Organics, Fair Lawn, NJ, SAD.

U **Tabeli 1.** prikazana su antitela korišćena u Western blot analizi. Polivinilidendifluorid (PVDF) membrana i 20 x koncentrovani supstrat za hemiluminiscenciju (eng. *enhanced chemiluminescence, ECL*) proizvodi su firme Millipore Cooperation Biotechnology, SAD.

Za izolaciju RNK korišćen je TRIzol reagens, proizvod firme Invitrogen, SAD. Za prepisivanje totalne RNK u cDNK upotrebljen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, proizvod firme Applied Biosystems, SAD. Za određivanje nivoa genske ekspresije različitih molekula postupkom lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (RTqPCR) korišćen je „SYBR green“ kit (Power SYBR Green PCR Master Mix Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Svi prajmeri korišćeni za RTqPCR nabavljeni su od firme Metabion, Nemačka (**Tabela 2**).

Tabela 1. Antitela korišćena u Western blot analizi

antitelo	proizvođač	kataloški broj	karakteristike
<i>PARP</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9542	primarno zečije poliklonsko
<i>mHsp70</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-66049	primarno mišije monoklonsko
<i>β-aktin</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-1615	primarno kozije poliklonsko
<i>α-tubulin</i>	Sigma Aldrich, SAD	T9026	primarno mišije monoklonsko
<i>c-jun</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-1694	primarno zečije poliklonsko
<i>prokaspaza 3</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7148	primarno zečije poliklonsko
<i>sečena kaspaza 3</i>	Cell Signaling Technology, SAD	9661S	primarno zečije poliklonsko
<i>Bcl-2</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-492	primarno zečije poliklonsko
<i>Bax</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-7480	primarno mišije monoklonsko
<i>Citohrom C</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-13561	primarno mišije monoklonsko
<i>kozje anti-zečije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2030	sekundarno
<i>magareće anti-kozije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2033	sekundarno
<i>magareće anti-mišije</i>	Santa Cruz Biotechnology, SAD	sc-2318	sekundarno

Tabela 2. Sekvence prajmera korišćene u analizi ekspresije gena za *Bcl-2*, *Bax*, *GAPDH* i *RPLT19*

Prajmer	Sekvence prajmera	Temperatura topljenja (°C)	Veličina produkta (bp)
<i>Bcl-2</i>	5'-TGGAAAGCGTAGACAAGGAGATGC-3'	65	88
	5'-CAAGGCTCTAGGTGGTCATTCAGG-3'	67	
<i>Bax</i>	5'-TGCTACAGGGTTTCATCCAG-3'	58	135
	5'-CCAGTTCATCGCCAATTCG-3'	57	
<i>GAPDH</i>	5'-GGCAAGTTCAATGGCACAGTCAAG-3'	65	125
	5'-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	65	
<i>RPLT19</i>	5'- TCGCCAATGCCAACTCTCGTC-3'	63	92
	5'- AGCCCGGGAATGGACAGT -3'	65	

2. Metode

2.1. Postupak sa životinjama

U eksperimentima korišćeni su mužjaci pacova Wistar soja, starosti 3 meseca (n=36–40 po eksperimentalnoj grupi). Masa životinja na početku eksperimenata bila je 300–350 g. Sve životinje su odgajane u vivarijumu Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, u standardnim laboratorijskim uslovima (konstantna temperatura od $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha od 55 %, svetlosni režim 12 h svetlost/12 h mrak, n=3–4 životinje po kavezu) i na *ad libidum* režimu ishrane.

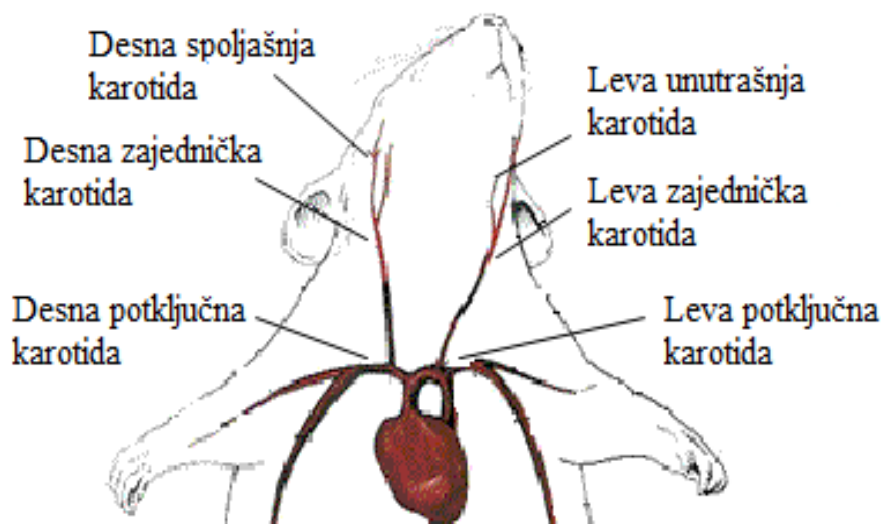
Rad sa eksperimentalnim životinjama je izveden u saglasnosti sa principima koje propisuje publikacija *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 80-23) i odobren od strane Etičkog komiteta za rad sa životinjama u istraživanjima Biološkog fakulteta i Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu (rešenje o odobrenju zavedeno pod brojem 02/11).

2.2. Trajne bilateralne okluzije karotidnih arterija

Eksperimentalne životinje bile su podeljene u sledeće grupe i podvrgnute operacijama:

1. Sh grupa– lažno-operisane životinje ostavljene na preživljavanju 3, 7 ili 90 dana;
2. 2VO grupa– jedinke podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija i ostavljene na preživljavanju 3, 7 ili 90 dana.

Mužjaci su anestetizirani 5 % hloral-hidratatom (400 mg/kg). Nakon anestetiziranja napravljen je rez na sredini ventralne strane vrata, neposredno iznad grudne kosti, pronađene su karotidne arterije (bilateralno izložene) i nežno razdvojene od okolnog tkiva i nerva vagusa. Svaka arterija je zatim dvostruko podvezana sa 3-0 hirurškim svilenim koncem. Kontrolna grupa je lažno operisana, odnosno jedinke su podvrgnute identičnoj operacionoj proceduri, koja je podrazumevala manipulaciju obema arterijama, međutim arterije im nisu podvezane.



*Slika 15. Shematski prikaz položaja karotidnih arterija.
(www.biologycorner.com/worksheets/rat_circulatory.html)*

2.3. Tretman estradiolom

Eksperimentalne životinje su bile podeljene u dve grupe:

1. 2VO + V grupa– jedinice podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija i tretirane 7 dana lanenim uljem;
2. 2VO + E grupa– životinje podvrgnute operaciji trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija i tretirane 7 dana estradiolom (33.3 µg/kg/dan, rastvoren u lanenem ulju).

Hormon je apliciran u vidu intraperitonealnih injekcija, jednom dnevno u jutarnjim časovima, između 09:00–10:00 h, tokom sedam sukcesivnih dana. Upotrebljena doza estradiola je u skladu sa fiziološkim dozama korišćenim u istraživanjima u kojima je prijavljeno da hroničan tretman estradiolom dovodi do neuroprotekcije nakon privremene globalne moždane ishemije (Noppens i saradnici, 2009).

2.4. Žrtvovanje životinja i priprema tkiva

Životinje za imunohistohemijske analize anestezirane su sa 5 % hloral-hidratom (400 mg/kg), perfundovane sa 0.9 % NaCl (~ 200 ml po životinji) i 4 % paraformaldehidom (PFA). Nakon brze i pažljive izolacije, mozgovi su fiksirani u 4 % PFA rastvoru, 24 h na 4°C i potom dehidratirani u gradijentu saharoze u 0.2 M fosfatnom puferu (10 %, 20 %, 30 %, rastvor saharoze, u svakom po 24 h na 4°C).

Mozgovi su zamrznuti u izopentanu, osušeni na suvom ledu i čuvani na -70°C do upotrebe.

Ostale životinje su žrtvovane dekapitacijom pomoću giljotine (Harvard Apparatus, Holliston, SAD), u odgovarajućim vremenskim tačkama nakon operacije. Posle izolacije celih mozгова, u prvom delu eksperimenta izolovani su kora prednjeg mozga i hipokampus radi izolacije grube membranske frakcije (P2), a u drugom delu eksperimenta izolovani su prečea kora (čiji je položaj određen na osnovu bregme, 1 mm od bregme ka vrhu celog mozga) i hipokampus koje su potom zamrzavane u tečnom azotu radi analize fragmentisanosti DNK i određivanja nivoa proteinske i genske ekspresije.

2.5. Analiza fragmentisanosti ćelijske DNK pomoću difenilamin metode

Smrznuta tkiva (n= 8–10 po eksperimentalnoj grupi) kore prednjeg mozga, prečea kore i hipokampusa homogenizovana su u puferu koji sadrži 5 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM Na₂EDTA i 0.5 % Triton X-100. Dobijeni homogenati su potom centrifugirani na 27000 g, 20 min radi izdvajanja intaktnog hromatina u talogu od fragmentisane DNK koja ostaje u supernatantu. Dobijenim supernatantima dodavana je 5.5 N perhlorna kiselina (PCA), a talogu 0.5 N PCA, tako da je finalna koncentracija u svim uzorcima bila 0.5 N. Uzorci su potom zagrevani 15 min na 90°C i centrifugirani na 1500 g, 10 min, na 4°C da bi se uklonili proteini. Dobijenim supernatantima je dodavan agens koji se vezuje za deoksiribozu– difenilamin i uzorci su ostavljeni 16–20 h na sobnoj temperaturi da bi se razvila reakcija koja se detektuje pojavom plave boje. Absorbanca uzoraka je merena na 600 nm, a nivo fragmentisane DNK u uzorcima je izražavan kao procenat ukupne DNK u supernatantu. Fragmentisana DNK u uzorcima izolovanim iz 2VO životinja 3, 7 ili 90 dana nakon operacije, kao i 7 dana nakon operacije i tretmana estradiolom, izražavana je kao procenat u odnosu na fragmentaciju u kontrolnim uzorcima (Bagchi i saradnici, 1999).

2.6. Bojenje sa Fluoro-Jade B i Hoechst 33258

Mozgovi životinja svih eksperimentalnih grupa (n= 2–3 po grupi) za imunohistološku analizu sečeni su na preseke debljine 16 µm i 25 µm na kriotomu (Leica, Nemačka).

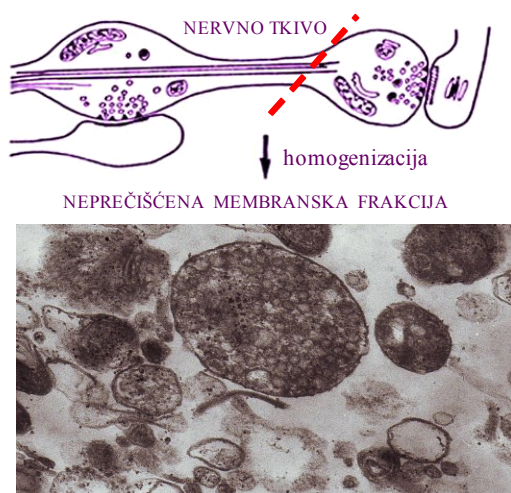
Preseci su direktno lepljeni na želatinizovane mikroskopske pločice, sušeni preko noći i zamrzavani na -20°C do upotrebe.

Fluoro-Jade B bojenje je korišćeno za detekciju neurona u procesu degeneracije, a *Hoechst 33258* boja je upotrebljena za analizu stanja hromatina. Pločice sa presecima su prvo uranjane u 80 % alkoholni rastvor sa 1 % NaOH i inkubirane sa 0.06 % KMnO_4 rastvorom 10 min, zatim su prebacivane u 0.0001 % rastvor *Fluoro-Jade B* u 0.1 % sirćetnoj kiselini i nakon 10 min su ispirane u bidestolovanoj vodi (ddH_2O) 3 x po 1 min, uranjane u 0.01 % *Hoechst 33258* 10 min, potom u ksilol, radi potpune dehidracije i prekrivene glicerolom i pokrovnim staklom. Preseci su posmatrani na Axio Observer Mikroskopu Z1 (Zeiss, Jena, Nemačka), koristeći sistem filtera kojima se mogu uočiti neurodegenerativne promene pomoću fluorescein izocianata. Čelije obojene ovom bojom jasno se mogu detektovati kao male svetlo zelene tačke koje se razlikuju u odnosu na pozadinu (Drakulić i saradnici, 2013).

2.7. Izolovanje proteina za Western blot analizu

Za određivanje nivoa proteinske ekspresije u kori prednjeg mozga, prečione kore i hipokampusu je korišćena gruba membranska P2 frakcija, kao i specifične subćelijske frakcije: citosolna frakcija (citosol), jedarna frakcija (nukleosol) i mitohondrijska frakcija (mitosol).

U prvom delu eksperimenta nakon izolovanja, celi mozgovi su ispirani u izolacionom puferu (0.32 M saharoza, 5 mM Tris-HCl, pH 7.4), a moždane strukture, kora prednjeg mozga i hipokampus, su izolovane na ledu. Pojedinačne moždane strukture životinja iste eksperimentalne grupe (4 eksperimentalnoj grupi/izolaciji) spajane su i homogenizovane, u 10 zapremina izolacionog pufera, u staklenom homogenizeru sa teflonskim klipom (zazor između homogenizera i klipa je 0.20 mm). Klip je bio pričvršćen na motor i homogenizacija se odvijala na 900 rpm sa 20 pokreta na 4°C. Nakon homogenizacije tkiva, homogenat je centrifugiran na 1000 g, 10 min, na 4°C. Supernatant je odliven i sačuvan, a talog, u kome su nehomogenizovani fragmenti i jedra, ispiran je centrifugiranjem pri istim uslovima sa još 10 ml izolacionog pufera.



Slika 16. Gruba neprečišćena membranska frakcija iz homogeniziranog nervnog tkiva

Supernatanti su spajani i centrifugirani na 12000 g (9800 rpm u JA-20 rotoru), 25 min, na 4°C. Dobijeni talog sadrži, pored sinaptozoma (nervnih završetaka), mitohondrija i određeni procenat membranskih fragmenata koji potiču od liziranih sinaptozoma, nervnih i glijskih ćelija i zato je označen kao neprečišćeni sinaptosomalni preparat ili gruba membranska frakcija (Gray i Whittaker, 1962) (**Slika 16**).

Citosolna, jedarna i mitohondrijske frakcija dobijena je iz pojediničnih hipokampusu i Pfc (n=8–10 po grupi). Tkivo je homogenizovano u staklo-teflonskom Potter-Elvehjem homogenizeru u 2 zapremine hladnog (4°C) pufera, koji je sadržao: 10 % glicerol, 50 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM Na₂EGTA, 2 mM DTT, inhibitore proteaza (20 mM Na₂MoO₄, 0.15 mM spermin, 0.15 mM spermidin, 0.1 mM PMSF, 5 µg/ml antipain, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml tripsin inhibitor i 3 mM benzamidin), kao i inhibitore fosfataza (20 mM β-glicerofosfat, 5 mM Na₄P₂O₇ x 10H₂O, 2 mM Na₃VO₄ i 25 mM NaF). Homogenat je centrifugiran na 2000 g, 10 min, na 4°C (Eppendorf 5417 centrifuga), nakon čega je supernatant korišćen za dobijanje citosola i mitohondrijske frakcije, dok je talog korišćen za dobijanje jedarnog ekstrakta. Centrifugiranjem supernatanta koji se koristi za izolaciju mitohondrijalne frakcije na 20000 g, 30 min staložene su mitohondrije, a dobijeni supernatant je dalje centrifugiran na ultracentrifugi na 105000 g, 60 min u cilju izdvajanja citosola. Talog jedara opran je u 0.5 ml homogenizacionog pufera i ponovo centrifugiran na 2000 g, 10 min, na 4°C (Beckman centrifuga, Nemačka). Isprana jedra su potom resuspendovana u 0.5 ml homogenizacionog pufera koji je sadržao 0.5 M NaCl. Ovakva smeša je potom inkubirana 60 min na ledu uz povremeno mešanje na vorteksu. Posle inkubacije, jedarna suspenzija je centrifugirana na 8000 g, 10 min, na 4°C, a dobijeni supernatant se koristio kao jedarni ekstrakt.

Za dobijanje mitohondrijskog ekstrakta, mitohondrije su isprane u 0.5 ml homogenizacionog pufera i ponovo centrifugirane na 20000 g, 30 min, na 4°C. Isprane mitohondrije su potom resuspendovane u puferu za lizu mitohondrija koji je sadržao

0.05 % Triton X-100. Nakon inkubiranja na ledu 90 min, mitohondrijska suspenzija je centrifugirana na 20000 g, 60 min, na 4°C u cilju dobijanja mitohondrijske frakcije (Drakulić i saradnici, 2013).

Stepen prečišćenosti subćelijskih frakcija proveren je metodom Western blot korišćenjem antitela na mHsp70, α -tubulin i c-jun, koja specifično detektuju proteine mitohondrija, citosola, odnosno jedara, te isključuju međusobnu kontaminaciju.

2.8. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima je određivana po metodi Lowry-a (1951) koja je modifikovana po Markwell-u (1978). Metoda se koristi kada je očekivana koncentracija proteina u uzorku u opsegu od 1 mg/ml do 10 mg/ml. Standard za određivanje koncentracije proteina je BSA u koncentracijama 0.2–10 mg/ml.

Korišćeni su sledeći reagensi:

Reagens A: 2 % Na_2CO_3 + 0.4 % NaOH + 0.16 % Na-K-tartarat + 1 % SDS;

Reagens B: 4 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$;

Reagens C: Reagens A: Reagens B (100:1), pravi se neposredno pre upotrebe;

Reagens D: Folin & Ciocalteus Phenol reagens se razblažuje u ddH₂O u odnosu 1:1.

Postupak: Za svaki uzorak (BSA STANDARD/UZORAK) su urađena triplikatna merenja. Slepna proba (blank) je sadržala 900 μl ddH₂O, bez proteina, dok je u ostale epruvete dodavano po 10 μl rastvora BSA/UZORKA i ddH₂O do finalne zapremine od 900 μl . U epruvete je potom dodavano po 100 μl 1 M NaOH, dobro promešano i smeša je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodavano 3 ml rastvora C, ponovo promešano i ostavljeno da stoji 20 min. Po isteku tog vremena, dodavano je 0.3 ml reagensa D, promešano i smeša je inkubirana 45 min na sobnoj temperaturi, do razvijanja boje. Optička gustina (OD) je merena na talasnoj dužini od 750 nm na spektrofotometru S-30 Boeco, Nemačka.

Na osnovu OD_{750nm} očitanih vrednosti za BSA konstruisana je prava i sa nje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD_{750nm} za uzorak.

2.9. Elektroforeza proteina i Western blot analiza

Ekspresija specifičnih molekula na nivou proteina ispitivana je Western blot analizom. Analizirani su apoptotski proteini u P2 frakcijama izolovanim iz kore prednjeg mozga i hipokampusa životinja podvrgnutih operaciji bilateralnih okluzija, kao i u subćelijskim frakcijama izolovanim iz prečeeone kore i hipokampusa mužjaka pacova Wistar soja podvrgnutih hroničnom tretmanu E-om, kao i kod odgovarajućih kontrola.

2.9.1. Priprema uzoraka i SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Koncentracije proteina u uzorcima su svedene na 2.5 mg/ml pomoću pufera za izolaciju. Neposredno pred upotrebu alikvoti su pomešani sa puferom za pripremu uzoraka proteina za SDS-PAGE (*2 x Sample Buffer*) i β -merkaptetanom u odnosu 1:9. Posle kuvanja na 100°C, 5 min, uzorci su ohlađeni i nanošeni na SDS-poliakrilamid gel.

Proteini su razdvajani po molekulskoj masi na denaturišućoj SDS-poliakrilamid gel elektroforezi (Laemmli, 1970). Elektroforeza je rađena na sistemu Mini Protean II (Bio Rad). Proteini su prvo koncentrovani na 5 % gelu i potom razdvajani na 8 %, 10 % ili 12 % poliakrilamidnim (PAA) denaturišućim gelovima u puferu za elektroforezu koji sadrži 0.25 M TRIS bazu, 0.192 M glicin i 0.1 % SDS. Na gel nanošeno je po 16 μ l pripremljenih uzoraka ($\sim 40 \mu$ g). Elektroforeza je trajala oko 90 min pri konstantnom naponu od 100 V na sobnoj temperaturi. Posle elektroforeze gelovi su korišćeni za Western blot analizu. Kao molekulski marker korišćen je Cruz MarkerTM Molecular Weight Standards (Santa Cruz Biotechnology), koji se sastoji od 9 proteina različitih molekulskih masa (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa).

2.9.2. „Western blot“ analiza

Nakon završene elektroforeze, gelovi su potapani u pufer za transfer (20 % metanol, 0.025 M TRIS HCl, 0.192 M glicin, pH 8.3). PVDF membrana odgovarajuće veličine prvo je aktivirana 15 sek u 100 % metanolu, zatim 2 min ispirana ddH₂O i potapana u transfer pufer. Nakon 5–10 min, formiran je sendvič koji se sastojao, redom, od jednog papira Whatman GB003 (Whatman Inc, Velika Britanija), poliakrilamidnog gela, PVDF membrane i jednog papira Whatman (svi natopljeni puferom za transfer). Ovako napravljen „sendvič“ postavljan je u ram aparata za transfer (Trans-Blott Cell, Bio Rad,

SAD) i potopljen u pufer za transfer. Prenos proteina sa gela na PVDF membranu odvijao se pri konstantnom naponu od 100 V, 60 min, na 4°C.

Nakon transfera, PVDF membrane su bojene 1 % rastvorom Ponceau S u 5 % sirćetnoj kiselini, da bi se utvrdila efikasnost transfera. Boja Ponceau S uklanjana je ispiranjem vodom. Potom su PVDF membrane inkubirane 1–2 h u puferu za blokiranje, 5 % nemasnom mleku (NFM) u prahu ili 5 % BSA rastvorenom u TBST puferu (50 mM TRIS HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-20), na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon toga tretirana membrana je sečena na određenim molekulskim težinama i inkubirana preko noći sa primarnim antitelima na PARP, mHsp70, α -tubulin, c-jun, prokaspazu 3, sečenu kaspazu 3, Bcl-2, Bax, citohrom c i β -aktin, na 4°C. Razblaženja primarnih antitela su sledeća: PARP (1:1000, TBST, 5 % BSA), sečena kaspaza 3 (1:250, TBST, 5 % BSA); mHsp70, α -tubulin, c-jun, prokaspaza 3, Bcl-2 i Bax (1:1000, TBST, 2.5 % NFM), citohrom c (1:250, TBST) i β -aktin (1:2500, TBST). Po završenoj inkubaciji sa primarnim antitelom, membrane su ispirane 5 x po 5 min TBST puferom na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1.5 h uz mućkanje sa sekundarnim anti-mišjim, anti-zečijim ili anti-kozmim antitelom konjugovanim sa HRP (razblaženje 1:5000, TBST). Nakon inkubacije, membrane su opet ispirane 5 x po 5 min u TBST puferu i nanošen je ECL.

Membrane su inkubirane u ECL supstratu 5 min, nakon čega su osušene, pokrivene tankom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filma. Na pokrivenu membranu postavljen je rendgen film (Fuji, Japan), pri čemu je dužina ekspozicije varirala od 1–5 min. Intenzitet signala na filmu odgovarao je količini specifičnog proteina u analiziranim uzorcima. Imunohemiluminescentni signal koji potiče poreklom od ciljnog proteina kvantifikovan je denzitometrijski u programu za analizu slike ImageJ.

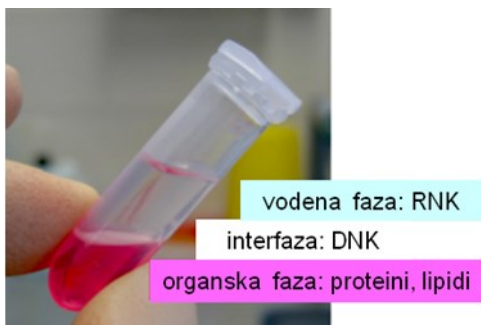
2.10. Izolacija RNK i priprema uzoraka za RTqPCR

2.10.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana po TRIzol metodi prema uputstvu proizvođača (Invitrogen, SAD). Naime, 50–100 mg smrznutog tkiva (n=18–20 po eksperimentalnoj grupi) homogenizovano je u 10 volumena TRIzol reagensa, u staklo-teflonskom homogenizeru (Potter-Elvehjem) sa 8–10 pokreta tučkom. Nakon inkubacije na 37°C u trajanju od

5 min, uzorci su centrifugirani na 12000 g, 15 min, na 4°C (Eppendorf 5417 Nemačka), kako bi se odvojio nesolubilni materijal.

Smeša je potom zagrevana u termo-bloku na 37°C, 5 min da bi disosovali preostali nukleo-proteinski kompleksi. Dodavano je 0.2 ml hloroforma na 1 ml korišćenog TRIzol reagensa i tube su snažno mućkane 15 sek. Uzorci su ponovo zagrevani u termo-bloku na 37°C, 2–3 min i centrifugirani na 12000 g, 15 min, na 4°C.



Nakon centrifugiranja u tubama su razdvojene tri faze:

1. donja, crveno-roza faza (hloroform);
2. interfaza, beličasta faza (fenol);
3. gornja, prozirna vodena faza.

Slika 17. Faze izolacije RNK.

RNK se nalazi u vodenoj fazi, dok proteini, lipidi i DNK ostaju u donjoj i interfazi. Zapremina vodene faze predstavlja oko 60 % početne zapremine TRIzola korišćenog za homogenizaciju.

2.10.2. Precipitacija RNK

Gornja faza (sa rastvorenim RNK) je prebacivana u novu tubu i dodavana je ista zapremina izopropanola. Posle inkubacije preko noći na -20°C uzorci su centrifugirani na 12000 g, 10 min, na 4°C i supernatant je odbacivan. Talog koji sadrži RNK je resuspendovan u 0.5 ml hladnog 75 % etanola, dobro promućkan i centrifugiran na 7500 g, 5 min, na 4°C. Dobijeni talog je osušen na vazduhu 10–15 min i onda rastvoren u 100 µl sterilne vode sa 0.1 % DEPC-om.

2.10.3. Određivanje koncentracije RNK

Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski na aparatu Nano Drop (Thermo Scientific, SAD), spektrofotometrijskim očitavanjem na 260 nm. Step prečišćenosti, odnosno, kontaminacije uzorka određen je iz odnosa apsorpcija na 260 nm i 280 nm (odnos $OD_{260} : OD_{280} \sim 2$ ukazuje na odsustvo proteina u analiziranom uzorku).

2.10.4. RNK elektroforeza

Integritet RNK određen je elektroforezom ukupne RNK na 1.6 % agarosi, u trajanju od 30 min, pri konstantnoj voltaži od 100 V.

2.10.5. Reverzna transkripcija (RT)

Za sintezu cDNK iz RNK korišćen je High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Ukratko, 2 µg totalne RNK korišćeno je u reakciji reverzne transkripcije (MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 U/µl) u prisustvu 2 µl oligo(dT) prajmera, 0.8 µl 100 mM dNTP miksa, 1 µl of RNase inhibitora i 10 x RT pufera u finalnoj zapremini 20 µl. Sintetisane cDNK su čuvane na -20°C do upotrebe.

2.10.6. Određivanje ekspresije gena za Bcl-2 i Bax tehnikom PCR-a u realnom vremenu

Za određivanje nivoa genske ekspresije različitih apoptotskih molekula korišćen je SYBR green protokol i kvantitativni PCR u realnom vremenu (RTqPCR, 7500 Real-time PCR System Applied Biosystems, SAD). cDNK umnožavana je koristeći prajmere karakteristične za anti-apoptotski molekul Bcl-2 (*Bcl-2*, **Tabela 2**), pro-apoptotski molekul Bax (*Bax*, **Tabela 2**) i tzv. „housekeeping” odnosno „kućepaziteljske” gene za ribozomalni protein L19 (eng. *60S ribosomal protein L19*, *RPL19*) i gliceralaldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*, **Tabela 2**).

Za umnožavanje cDNK korišćeni su sledeći uslovi: denaturacija 95°C/15 s; vezivanje prajmera 60°C/1 min, faza ekstenzije 60°C/1 min i finalna ekstenzija 72°C/5 min. Paralelno sa svakom PCR reakcijom, dobijena je i kriva topljenja proizvoda radi utvrđivanja njegove specifičnosti. Apsolutne vrednosti ekspresije iRNK svih uzoraka su normalizovane na signal *RPL19* uključen u svaku RTqPCR reakciju. U cilju procene efikasnosti amplifikacije (E) za svaki par prajmera korišćene su standardne krive. Efikasnost amplifikacije je dobijena iz nagiba krive (Ct-početak detektibilne amplifikacije u funkciji logaritma koncentracije cDNK) (Rutledge i Cote, 2003). Efikasnost PCR reakcije bila je slična za sve parove prajmera i kretala se u opsegu 0.96–0.99 (maksimalna moguća efikasnost je 1). Kvantifikacija relativne količine transkripata je rađena korišćenjem $\Delta\Delta C_T$ (Livak i Schmittgen, 2001).

3. Statistička obrada rezultata

Rezultati analize DNK fragmentisanost su predstavljeni kao srednje vrednosti dobijene iz dva nezavisna eksperimenta $\pm$ SEM (standardna greška merenja) na osnovu formule $\% \text{ fragmentisane DNK} = (\text{OD600 nmT} / \text{OD600 nm (T + B)}) \times 100$, T = fragmentisana DNK, B = intaktna DNA izolovane iz kore prednjeg mozga, prečeeone kore i hipokampus kontrolnih pacova i pacova podvrgnutih bilateralnim okluzijama, kao i životinja tretiranih E i njihovih odgovarajućih kontrola. Statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa su određene korišćenjem jednofaktorijalne analiza varijanse (engl. *one way analysis of variance* ANOVA), praćene odgovarajućim „multiple range” testom (*Tuckey post hock test*). Statistički značajne razlike su one čija je p vrednost bila manja od 0.05.

Kvantifikacija rezultata dobijenih Western blotom je izvršena denzitometrijskom analizom signala u programu za analizu slike ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Svi eksperimenti su ponovljeni dva puta, svaki put sa novom grupom kontrolnih jedinki i životinja podvrgnutim bilateralnim okluzijama, kao životinja tretiranih E i njihovim odgovarajućim kontrolama. Izmerene vrednosti OD signala su korigovane u odnosu na pozadinu i izražene u arbitrarnim jedinicama (count). Za Western blot sve vrednosti su izražene u odnosu na β -aktin sa istog blota, dok su u RTqPCR analizi sve vrednosti izražene u odnosu na *RPL19* iz istih uzoraka; svi rezultati su potom predstavljeni kao procenat od odgovarajuće kontrole. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost $\pm$ SEM. Obrada rezultata je urađena u softverskom programu Origin, verzija 7.0 (Jandel Corporation, SAD). Za procenu statističke značajnosti je korišćena jednofaktorijalna ANOVA i post hoc Tukey test. Za sve testove pretpostavljena statistička značajnost je $p < 0.05$.

REZULTATI

1. Efekat operacije podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija na smrtnost i telesnu masu jedinki

Lažno operisane životinje (Sh), koje su služile kao kontrola, ispoljile su nisku incidencu smrtnosti, dok je kod jedinki podvrgnutih operaciji podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija (2VO) stopa smrtnost bila najveća u vremenskom periodu 12–24 h nakon operacije, nakog čega je opadala sa protokom vremena. Ukupna stopa smrtnosti bila je oko 13 %, što je u skladu sa rezultatima studija drugih autora (Tanaka i saradnici, 1999; Fujishima i saradnici, 1976; Ogata i saradnici, 1976; Payan i saradnici, 1965).

Na početka eksperimenta prosečna telesna masa životinja iznosila je 339 ± 10 g. U postoperativnim danima (PD) 3 i 7, zapažen je značajan gubitak telesne mase u obe eksperimentalne grupe (**Tabela 3**). U najkasnijoj proučavanoj tački, zabeleženo je povećanje telesne mase kod svih jedinki, ali je uočena i manja razlika između eksperimentalnih grupa (**Tabela 3**).

Tabela 3. Efekat lažne operacije i zahvata podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija na telesnu masu jedinki.

Eksperimentalna grupa	Lažno-operisane životinje	2VO životinje
Telesna masa (g) 3 dana nakon zahvata	306 ± 10 *	303 ± 12 &
Telesna masa (g) 7 dana nakon zahvata	315 ± 7 *	311 ± 9 &
Telesna masa (g) 90 dana nakon zahvata	412 ± 14 *	382 ± 6 &#

Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja $\pm$ SEM; statistički značajne razlike su određene Studentovim t-testom u odnosu na početnu telesnu masu jedinki (* $p < 0.05$ početna telesna masa vs. lažno operisane, & $p < 0.05$ početna masa vs. 2VO životinje, # $p < 0.05$ lažno operisane vs. 2VO životinje).

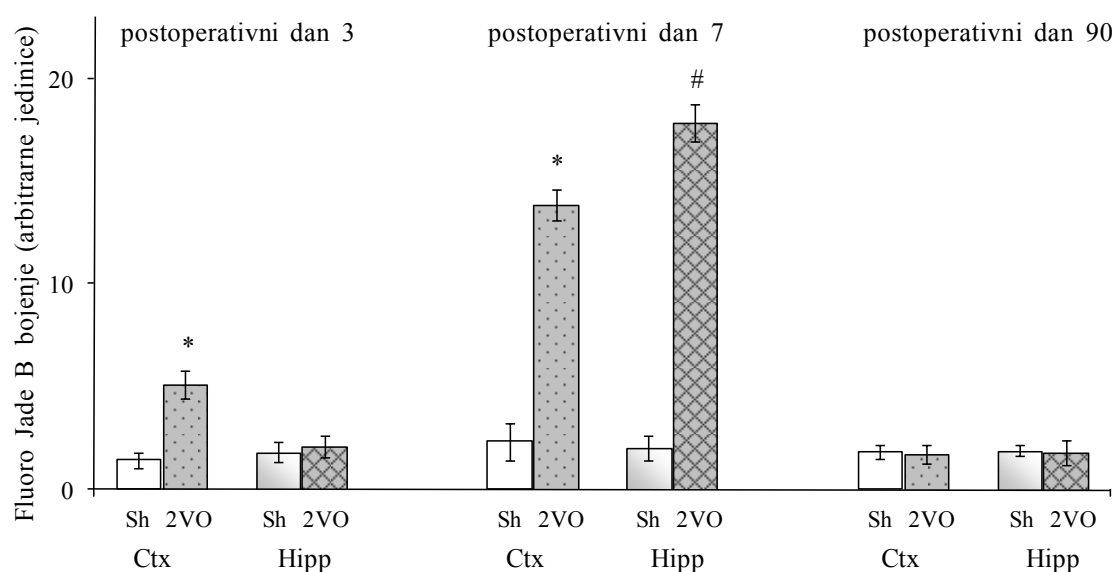
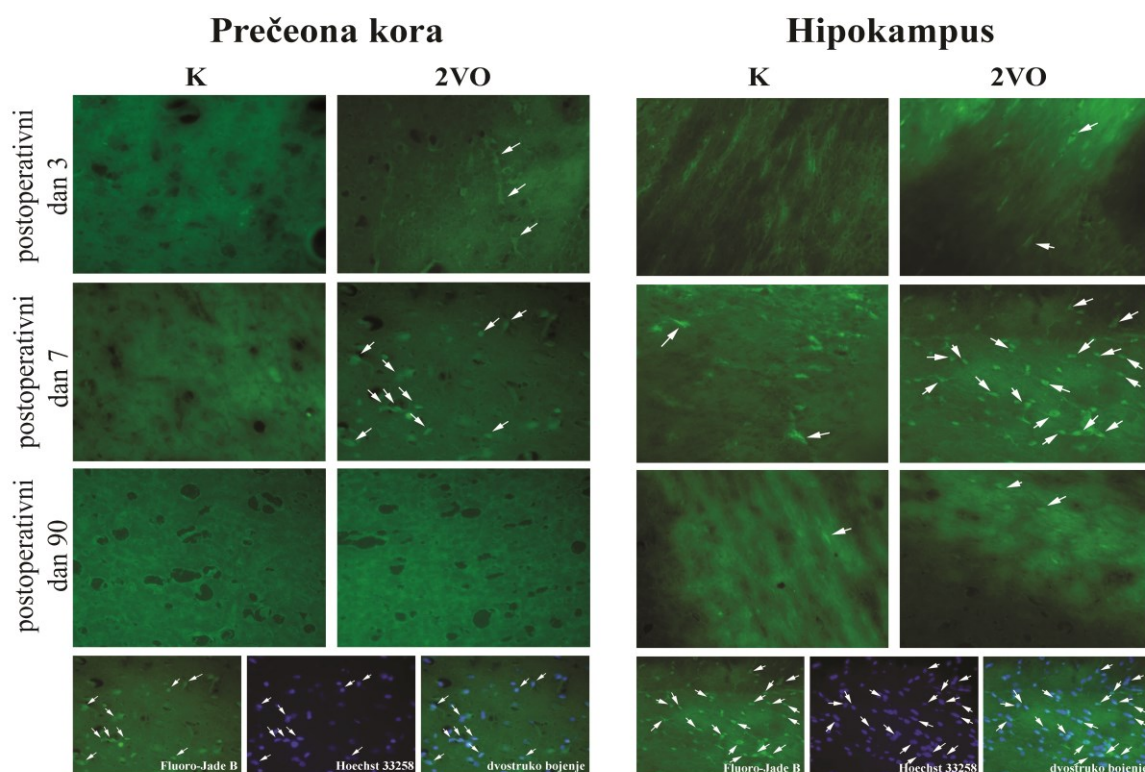
2. Efekat moždane hipoperfuzije na broj mrtvih ćelija u kori prednjeg mozga i hipokampusu

U zadatom model sistemu, u vremenskim tačkama 3 i 7 dana u kori prednjeg mozga (Ctx) i hipokampusu (Hipp) pomoću *Flouro-Jade B* bojenja detektovane su značajne promene u broju specifično obojenih mrtvih ćelija, dok 90 dana nakon zahvata kod 2VO životinja u odnosu na odgovarajuću lažno operisanu grupu životinja nisu uočene značajne razlike (**Slika 18A**). Kvantitativna analiza preseka Ctx i Hipp nakon *Flouro-Jade B* bojenja je prikazana na **Slici 18B**.

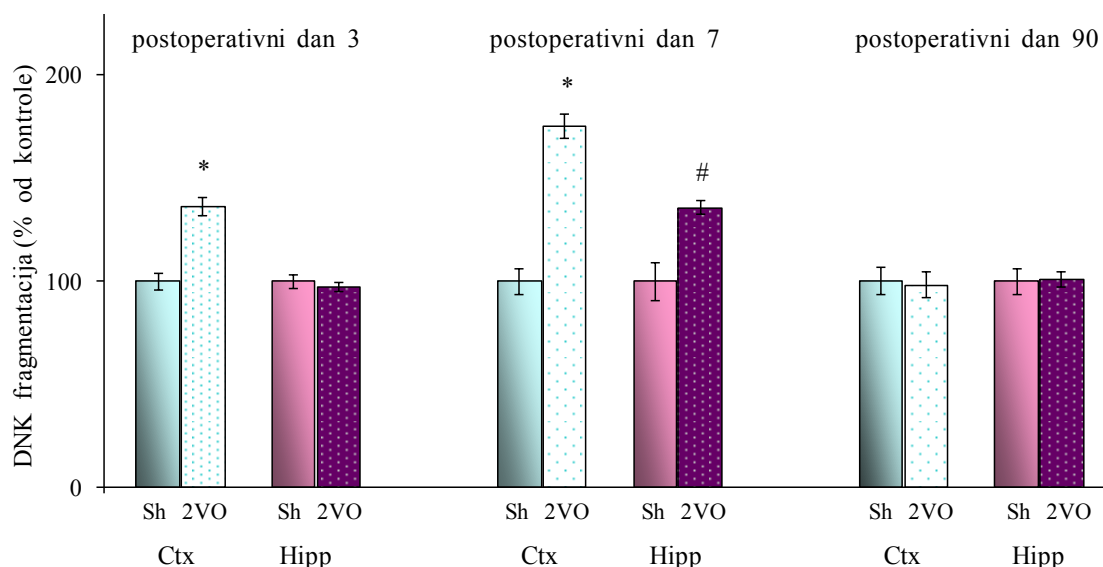
Da bi se ispitao način umiranja ćelija u Ctx i Hipp nakon nametanja stanja moždane hipoperfuzije, preseci su dodatno bojeni sa *Hoechst 33258*, plavom fluorescentnom bojom koja se specifično vezuje za DNK. Naime, u PD 3 i PD 7 u obe ispitivane moždane strukture uočeno je više od jednog preklapanja, što ukazuje da ćelije odumiru putem apoptoze (*Slika 18B*). Takođe, treba istaći da je u okviru Ctx, na nivou prečione kore (Pfc) detektovan najveći broj umrlih ćelija, shodno tome pri proučavanju efekata hroničnog tretmana estradiola u stanju nametnute moždane hipoperfuzije korišćen je ovaj anatomski region.

3. Fragmentacija jedarne DNK u kori prednjeg mozga i hipokampusu životinja izloženih podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija

U sledećem setu eksperimenata, u moždanim strukturama– Ctx i Hipp, određivan je nivo fragmentacije DNK i izražavan kao procenat od ukupne nefragmentisane genomske DNK (Filipkowski i saradnici, 1994). Kao što se može videti na *Slici 19*, u vremenski zavisnom odgovoru na stanje moždane hipoperfuzije, nivo fragmentacije DNK u Ctx u prve dve ispitivane vremenske tačke bio je znatno viši, dok je u PD 90 bio na nivou odgovarajuće lažno operisane grupe. U Hipp, nivo fragmentacije DNK bio je samo u PD 7 znatno viši u odnosu na lažno operisane životinje (*Slika 19*).



Slika 18. Efekti moždane hipoperfuzije na broj specifično obojenih apoptotskih ćelija u prečenoj kori i hipokampusu. Reprezentativne slike Fluoro-Jade B (A) bojenja i dvojnog Fluoro-Jade B i Hoechst 33258 bojenja (B) preseka prečeoone kore i hipokampusa lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Degenerisani neuroni su obeleženi strelicama. Kvantifikacija broja degenerisanih ćelija predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM (C). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u prečenoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u hipokampusu.



Slika 19. Efekat moždane hipoperfuzije na DNK fragmentaciju u prečenoj kori i hipokampusu pacova. Kvantifikacija količine fragmentisane DNK u kori prednjeg mozga i hipokampusu kod lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Vrednosti dobijene iz dva nezavisna eksperimenta (izračunate po sledećoj formuli: $\% \text{ DNK fragmentisana} = (OD_{600nm} T / OD_{600nm} (T+B)) \times 100$, T = fragmentisana DNK, B = nefragmentisana DNK izolovana iz moždanog tkiva životinja) predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u prečenoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u hipokampusu.

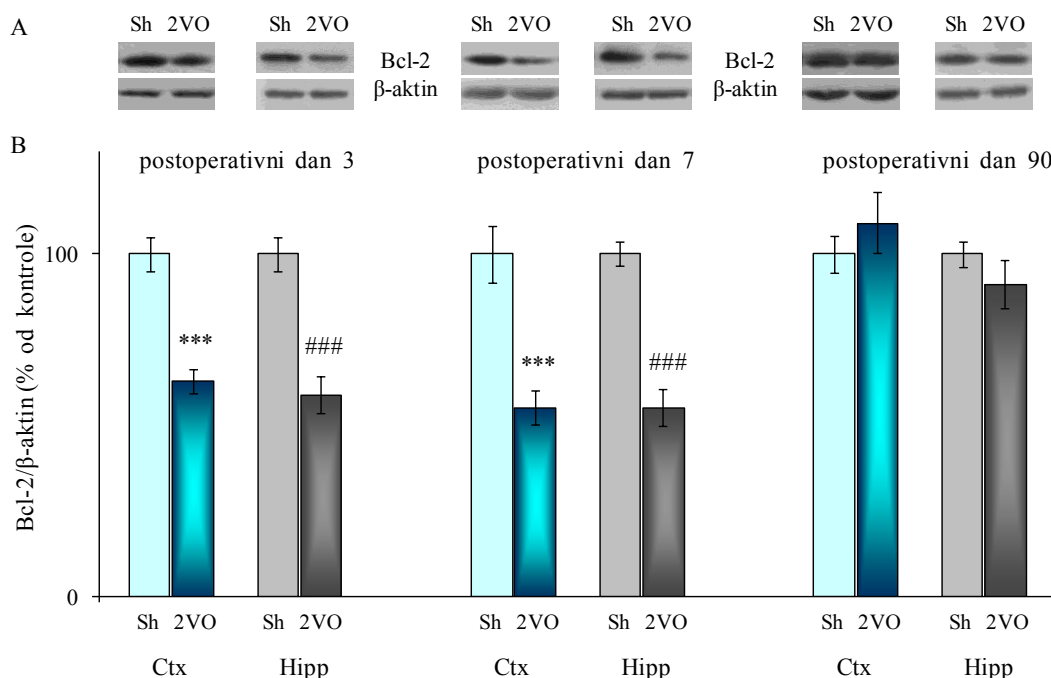
4. Efekat moždane hipoperfuzije na regulatore apoptoze u kori prednjeg mozga i hipokampusu

Nakon analize fragmentisanosti jedarne DNK i *Fluoro-Jade B* bojenja, ispitivan je efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju apoptotskih molekula u gruboj membranskoj frakciji (P2) Ctx i Hipp odraslih mužjaka pacova u tri različite vremenske tačke nakon operacije.

4.1. Vremenski zavisani odgovori kore prednjeg mozga i hipokampusa u stanju moždane hipoperfuzije

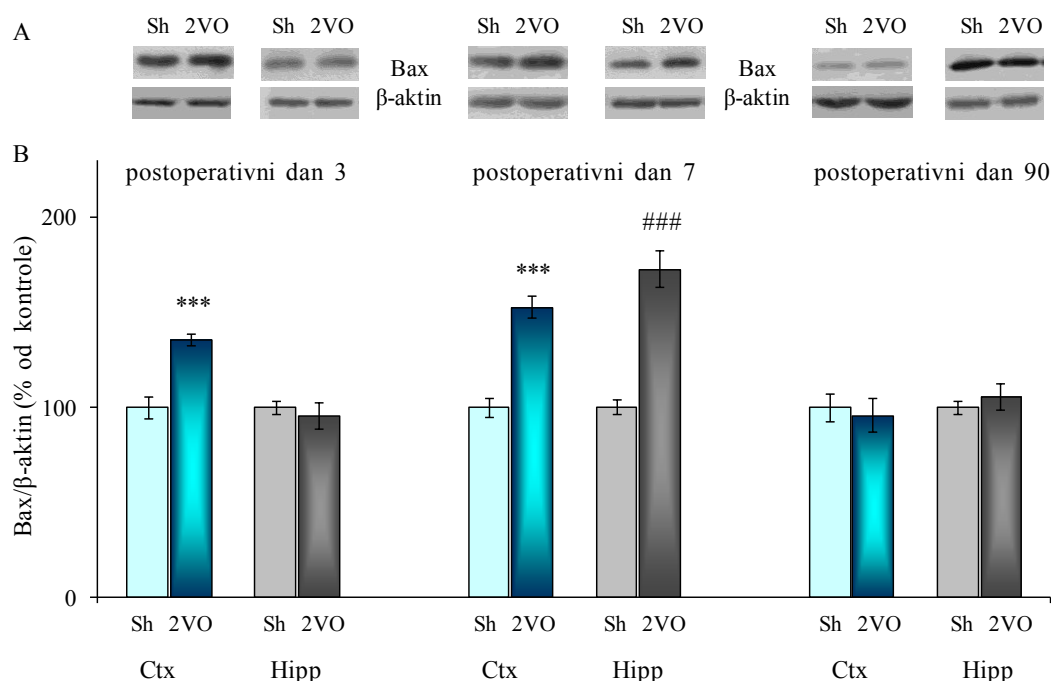
U cilju analize efekta moždane hipoperfuzije na pokretanje apoptoze mitohondrijskim putem, praćen je nivo pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije: Bcl-2 i Bax proteina.

Analiza ekspresije Bcl-2 proteina je pokazala statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa u obe ispitivane moždane strukture u ranim vremenskim tačkama ($p < 0.001$, **Slika 20**), dok je njegova ekspresija bila nepromenjena 90 dana nakon zahvata (**Slika 20**).



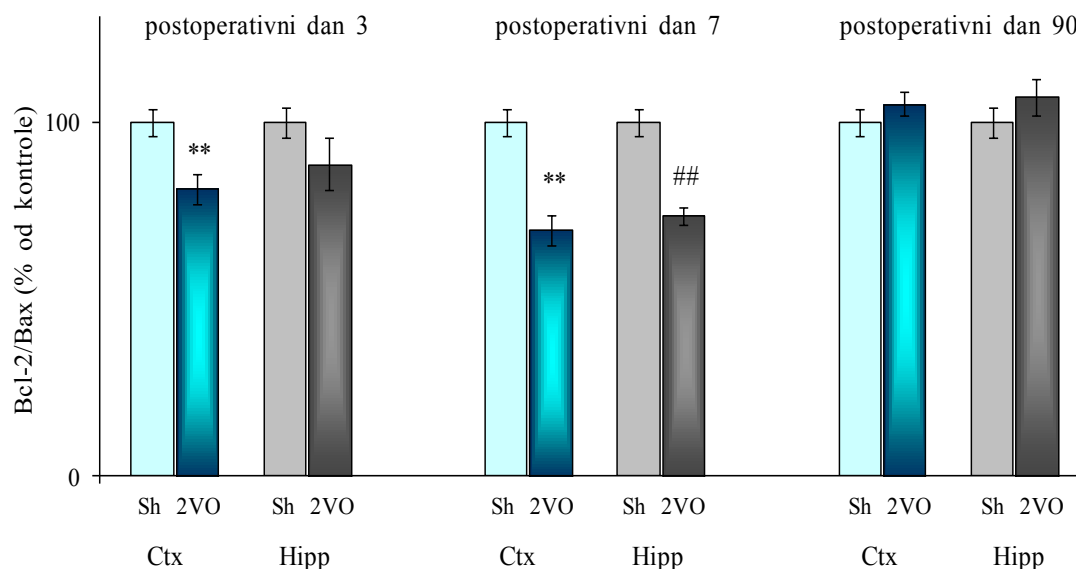
Slika 20. Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju Bcl-2 proteina u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji. Reprezentativni imunoblotovi za Bcl-2 protein (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bcl-2 iz dva nezavisna eksperimenata predstavljena kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u kori prednjeg mozga; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

Kao što je prikazano na **Slici 21**, u Ctx koncentracija Bax proteina je značajno povećanja kod 2VO životinja 3 i 7 dana nakon operacije u odnosu na lažno operisane životinje ($p < 0.001$), dok je nakon 90 dana bila nepromenjena. U poređenju sa lažno operisanom grupom, sadržaj Bax proteina je statistički značajno povećan u P2 frakciji Hipp u PD 7 ($p < 0.001$, **Slika 21**), dok u ostalim ispitivanim vremenskim tačkama je bio nepromenjen (**Slika 21**).



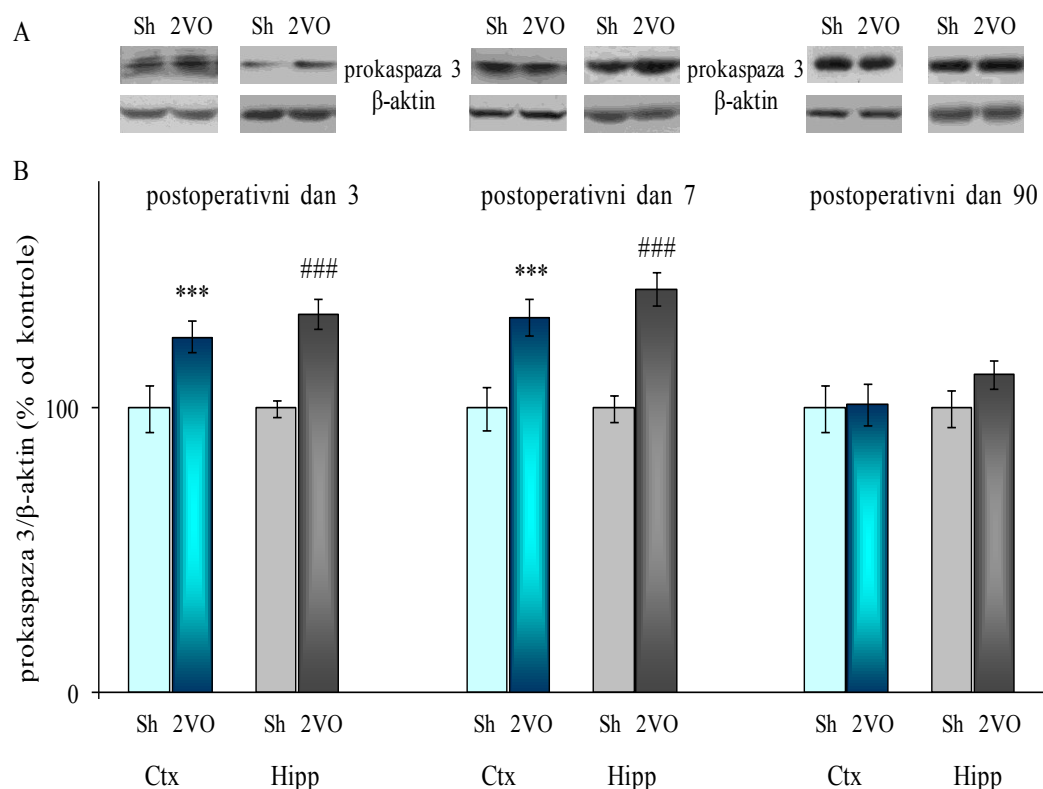
Slika 21. *Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju Bax proteina u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji. Reprezentativni imunoblotovi za Bax protein (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bax iz dva nezavisna eksperimenata predstavljena kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u kori prednjeg mozga; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.*

Ravnoteža između pro- i anti-apoptotskih članova Bcl-2 familije je od ključne važnosti za sudbinu ćelije. Direktno upoređivanje nivoa Bcl-2 i Bax proteina u P2 frakcijama izolovanim iz Ctx ukazuje da moždana hipoperfuzija smanjuje odnos Bcl-2/Bax proteina i pomera ovu fino regulisanu ravnotežu ka pro-apoptotskom molekulu Bax u ranim ispitivanim vremenskim tačkama ($p < 0.01$ **Slika 22**). U Hipp, ovaj odnos je ostao nepromenjen u vremenskim tačkama 3 i 90, i statistički značajno smanjen 7 dana nakon operacije ($p < 0.01$, **Slika 22**).



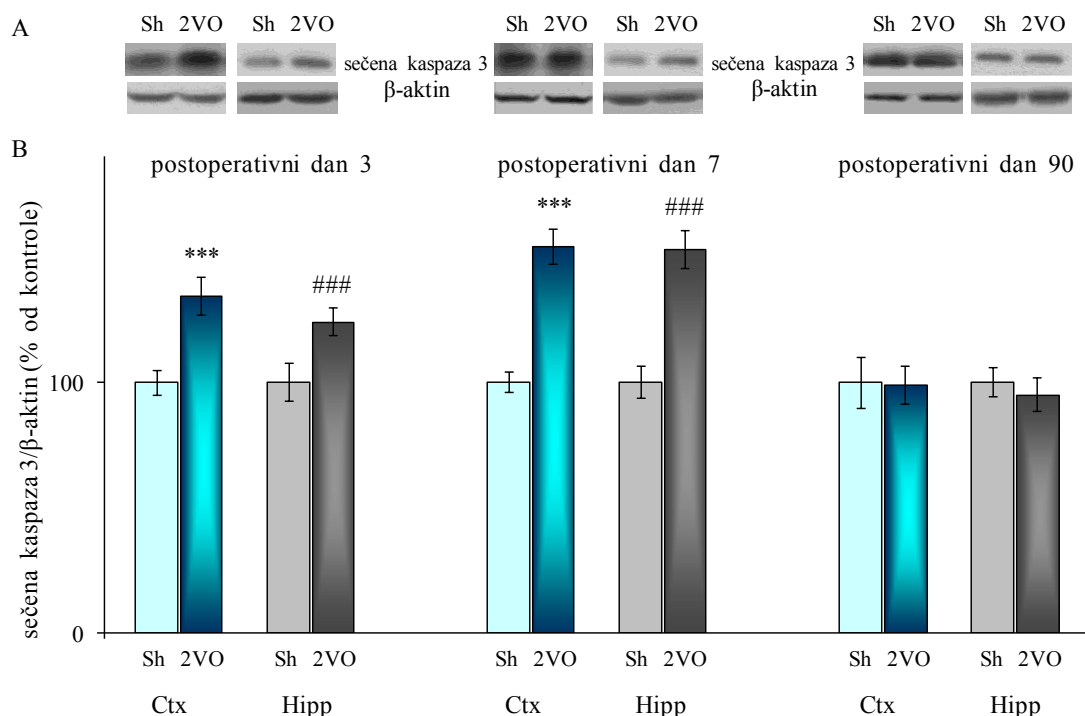
Slika 22. *Efekat moždane hipoperfuzije na relativan odnos Bcl-2/Bax proteina u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji. Kvantifikacija relativnog odnosa Bcl-2/Bax proteina lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene iz dva nezavisna eksperimenta. Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u kori prednjeg mozga; ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.*

Prokaspaza 3 je protein koji se konstitutivno eksprimira u mozgu. Pod dejstvom različitih stimulusa ona se seče i aktivira, čime nastaje kaspaza 3 koja dovodi do degradacije više od 40 različitih proteina, između ostalih i jedarnog enzima PARP. Dobijeni rezultati, analizom proteinske ekspresije prokaspaze 3, pokazuju statistički značajno povećanje koncentracije prokaspaze 3 u P2 frakcijama Ctx i Hipp u obe rane vremenske tačke ($p < 0.001$, **Slika 23**), dok se u PD-u 90 ekspresija ispitivanog proteina nije promenila ni u jednoj od dve ispitivane moždane strukture (**Slika 23**).



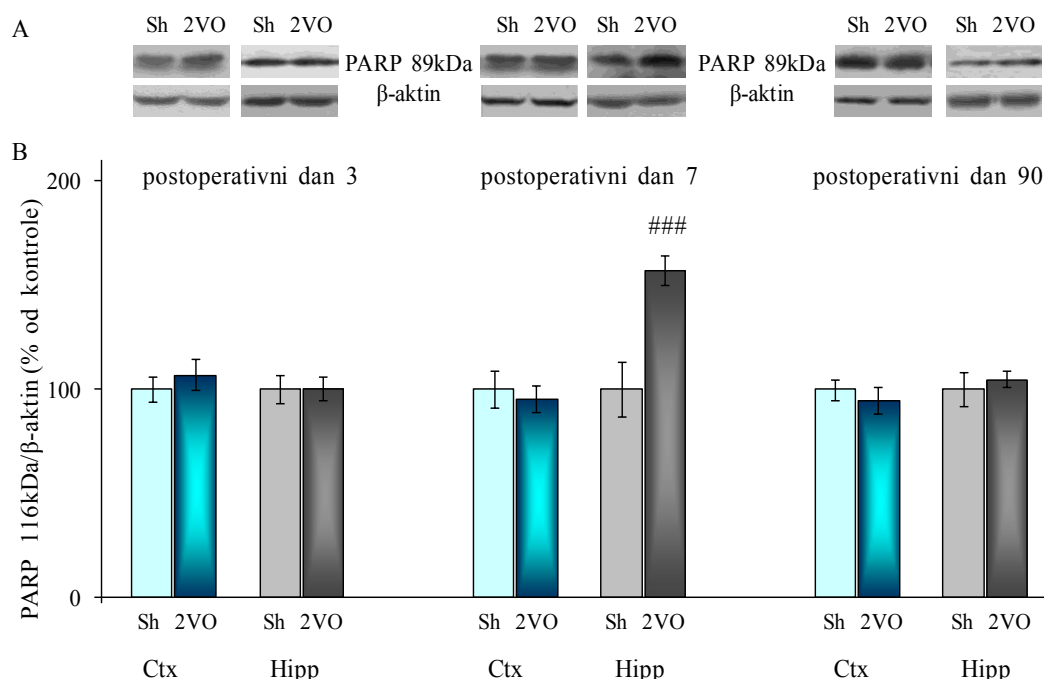
Slika 23. *Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju proteina prokaspaze 3 u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji.* Reprezentativni imunoblotovi za prokaspazu 3 (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za prokaspazu 3 iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u kori prednjeg mozga; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

U istim eksperimentalnim uslovima, detektovano je povećanje ekspresije zrele kaspaze 3 u PD 3 i PD 7 u obe moždane strukture (**Slika 24**), dok je u najkasnijoj ispitivanoj vremenskoj tački bila nepromenjena.



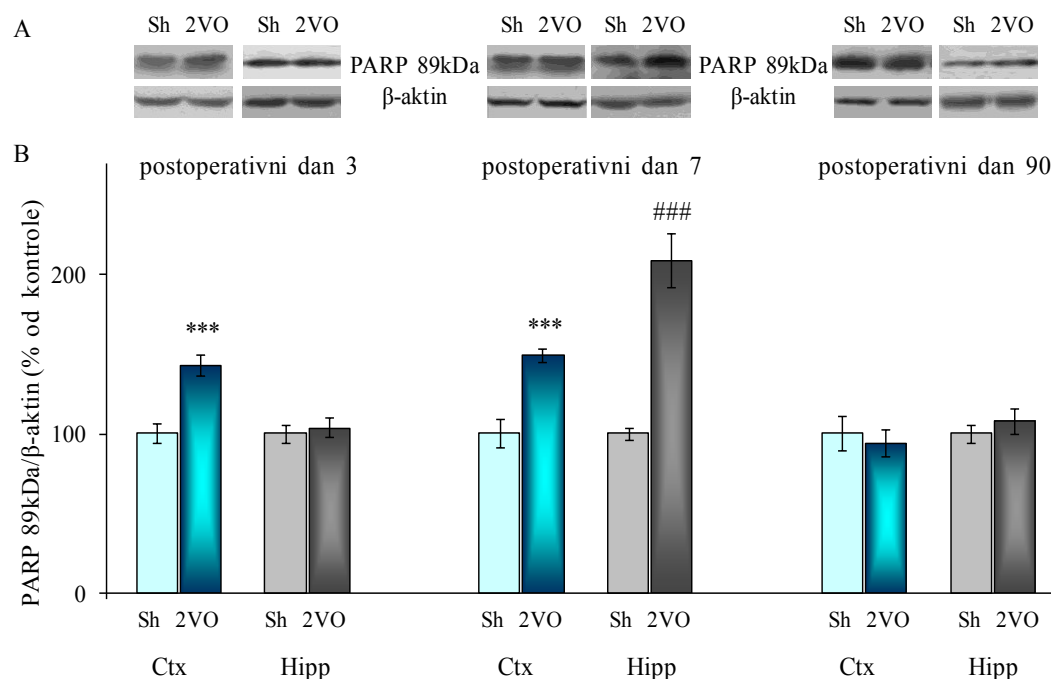
Slika 24. Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju proteina kaspaze 3 u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji. Reprezentativni imunoblotovi za kaspazu 3 (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za kaspazu 3 iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u kori prednjeg mozga; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

PARP je enzim uključen u reparaciju DNK (Satoh i Lindahl, 1992), čime se omogućava preživljavanje ćelije. Ovaj protein može biti isečen od strane mnogih ICE-sličnih kaspaza u *in vitro* uslovima (Lazebnik i saradnici, 1994) i jedan je od glavnih meta kaspaze 3 u *in vivo* uslovima (Schlegel i saradnici, 1996; Tewari i saradnici, 1995). Isečeni PARP protein doprinosi narušavanju ćelijskog integriteta i služi kao marker ćelija koje ulaze u apoptozu. Analiza ekspresije celovitog PARP (116 kDa) ni u jednoj od dve ispitane moždane strukture nije pokazala značajne razlike između životinja podvrgnutih lažnoj operaciji i 2VO životinja (**Slika 25**) u PD 3. U sledećoj ispitivanoj vremenskoj tački, uočeno je statistički značajno povećanje ekspresije u Hipp ($p < 0.001$, **Slika 25**), dok je ekspresija istog proteina u Ctx bila nepromenjena. Kao što se može videti na **Slici 25**, u PD 90 ekspresija celovitog PARP nije bila promenjena.



Slika 25. Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju celovitog PARP proteina u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji. Reprezentativni imunoblotovi za PARP protein (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za PARP protein iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

U poređenju sa lažno operisanim životinjama ekspresija sečenog velikog fragmenta ovog proteina (89 kDa) u Ctx bila je značajno povećana 3 i 7 dana nakon zahvata ($p < 0.001$, **Slika 26**). U Hipp njegova ekspresija nije bila promenjena u PD 3 i PD 90, a nakon 7 dana bila je statistički značajno povećana kod 2VO životinja u odnosu na lažno operisane ($p < 0.001$, **Slika 26**).

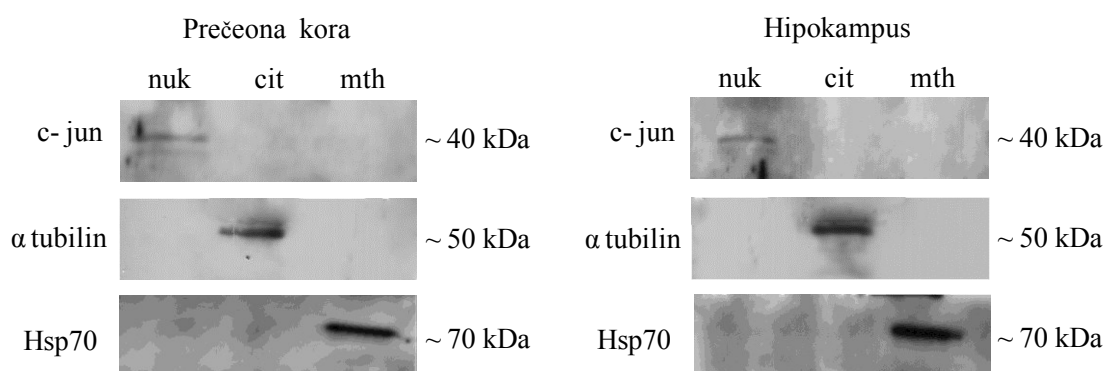


Slika 26. *Efekat moždane hipoperfuzije na ekspresiju sečenog fragmenta PARP proteina u kortikalnoj i hipokampalnoj P2 frakciji.* Reprezentativni imunoblotovi za sečeni fragment PARP proteina (A) lažno operisanih životinja (Sh) i pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija (2VO). Kvantifikacija proteinske ekspresije za sečeni fragmenat PARP proteina iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u kori prednjeg mozga; ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

5. Odgovor prečeeone kore i hipokampusa na tretman estradiolom u stanju hronične moždane hipoperfuzije

Kako je utvrđeno postojanje vremenski zavisnog odgovora i pokazano da se u nekim regionima kore prednjeg mozga uočava veći broj umrlih ćelija, dalje je proučavan efekat hroničnog tretmana estradiolom (E) na distribuciju pojedinih apoptotskih molekula u ćelijskim frakcijama prečeeone kore Pfc i Hipp u stanju nametnute moždane hipoperfuzije.

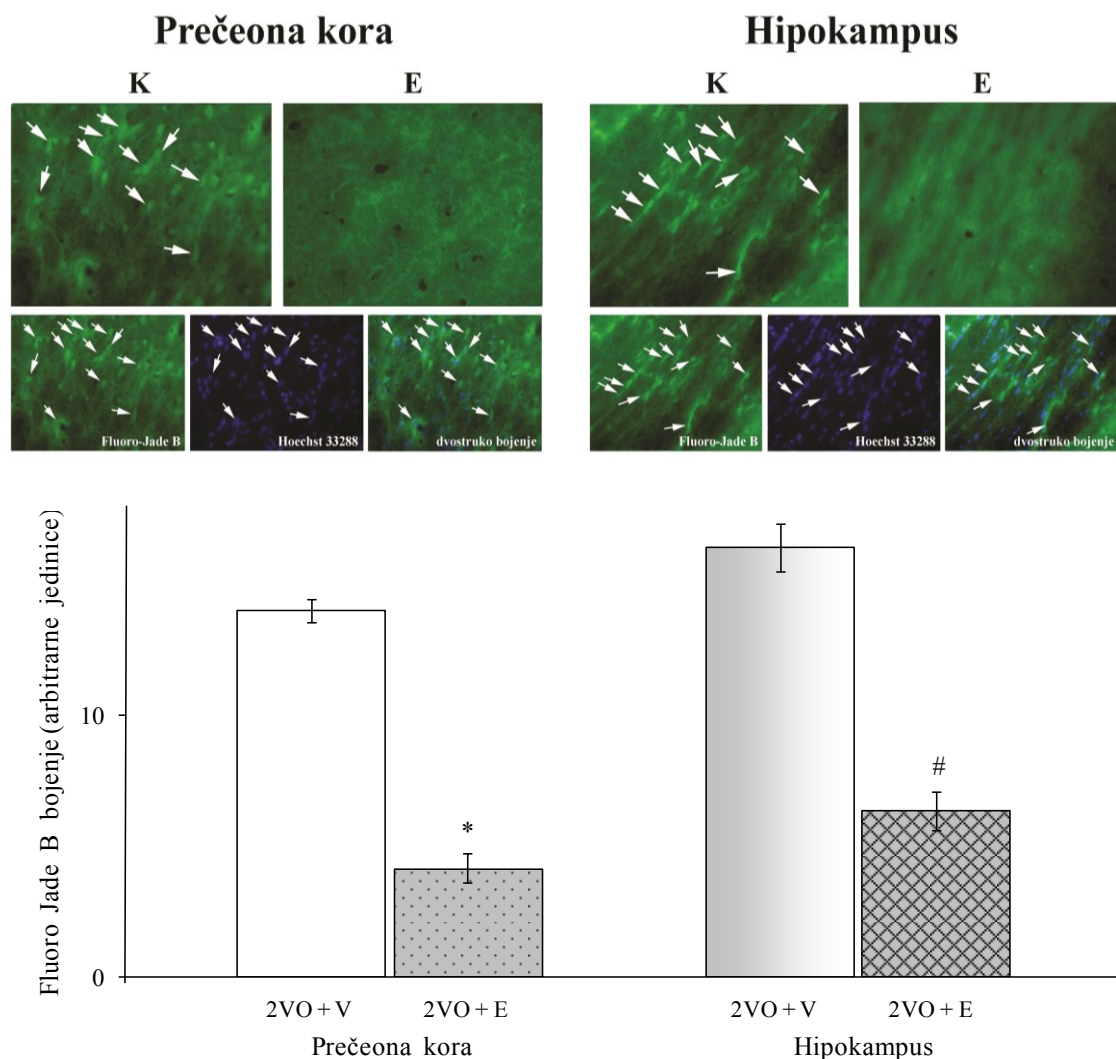
Čistoća izolovanih subćelijskih frakcija prečeeone kore i hipokampusa proverena je i potvrđena korišćenjem antitela na c-jun za jedarnu frakciju (nuk), α -tubulin za citosolnu frakciju (cit) i mHsp70 za mitohondrijsku frakciju (mth) (*Slika 27*).



Slika 27. Provera čistoće subćelijskih frakcija izolovanih iz prečeeone kore i hipokampusa.

5.1. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na broj mrtvih ćelija u prečeeonoj kori i hipokampusu u stanju moždane hipoperfuzije

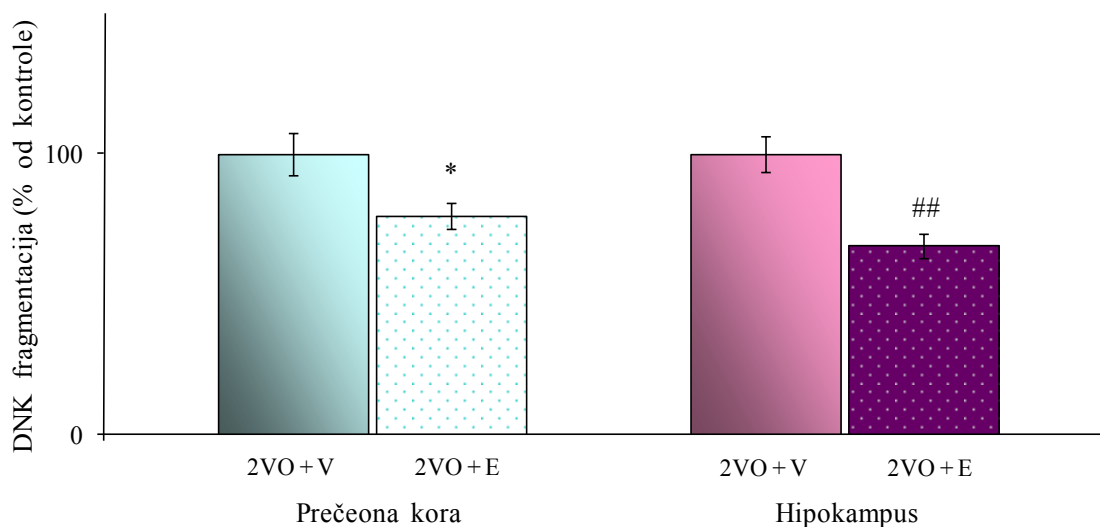
Da bi se ispitao neuroprotektivni efekat hroničnog tretmana estradiolom na broj mrtvih ćelija u prečeeonoj kori i hipokampusu u stanju moždane hipoperfuzije, odrasli mužjaci pacova Wistar soja tretirani su 7 dana intraperitonealnim injekcijama u ranim jutarnjim satima. U obe ispitivane moždane strukture pomoću *Fluoro-Jade B* bojenja detektovano je značajno smanjenje broja specifično obojenih mrtvih ćelija nakon E tretmana u odnosu na kontrolne odnosno 2VO životinje (*Slika 28*). Takođe, preseki dodatno bojeni sa *Hoechst 33258*, pokazali su manji broj mesta preklapanja, što je ukazalo na redukciju apoptotskih procesa (*Slika 28*).



Slika 28. Efekti hroničnog tretmana estradiolom na broj specifično obojenih apoptotskih ćelija u stanju nametnute moždane hipoperfuzije u prečeaonoj kori i hipokampusu. Reprezentativne slike Fluoro-Jade B (A) i dvojnog Fluoro-Jade B i Hoechst 33258 bojenja (B) preseka prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Degenerisani neuroni obeleženi su strelicama. Kvantifikacija broja degenerisanih ćelija predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM (C). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u prečeaonoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u hipokampusu.

5.2. Fragmentacija jedarne DNK u prečenoj kori i hipokampusu životinja izloženih hroničnom tretmanu estradiolom u stanju nametnute moždane hipoperfuzije

U odgovoru na hroničan E tretman, nivo fragmentacije DNK u prečenoj kori i hipokampusu bio je smanjen u odnosu na nivo odgovarajuće kontrolne grupe životinja (*Slika 29*).

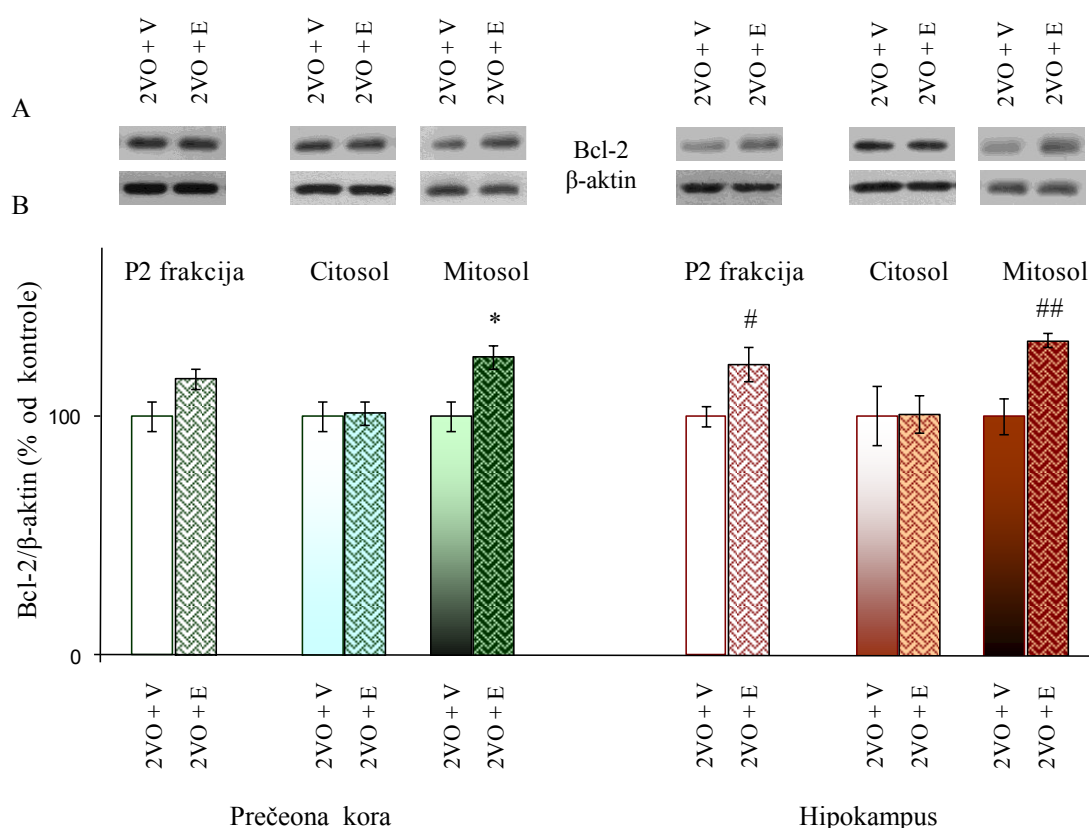


Slika 29. *Efekat hroničnog tretmana estradiolom na DNK fragmentaciju u prečenoj kori i hipokampusu pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Kvantifikacija količine fragmentisane DNK u prečenoj kori i hipokampusu kod kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Vrednosti dobijene iz dva nezavisna eksperimenta (izračunate po sledećoj formuli: $\% \text{ DNK fragmentata} = (OD_{600nm}T / OD_{600nm}(T+B)) \times 100$, $T = \text{fragmentisana DNK}$, $B = \text{nefragmentisana DNK izolovana iz moždanog tkiva životinja}$) predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u prečenoj kori; ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.*

5.3. Efekat tretmana estradiolom na subćelijsku distribuciju i gensku ekspresiju Bcl-2 i Bax u prečenoj kori i hipokampusu u stanju hronične moždane hipoperfuzije

Kao što je prikazano na *Slici 28*, u P2 frakciji izolovanoj iz Hipp koncentracija Bcl-2 proteina značajno je povećana kod E tretiranih životinja u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu (121.85 ± 6.93 , $p < 0.05$), dok analiza ekspresije istog proteina u prečenoj kori nije pokazala statistički značajne razlike između eksperimentalnih grupa.

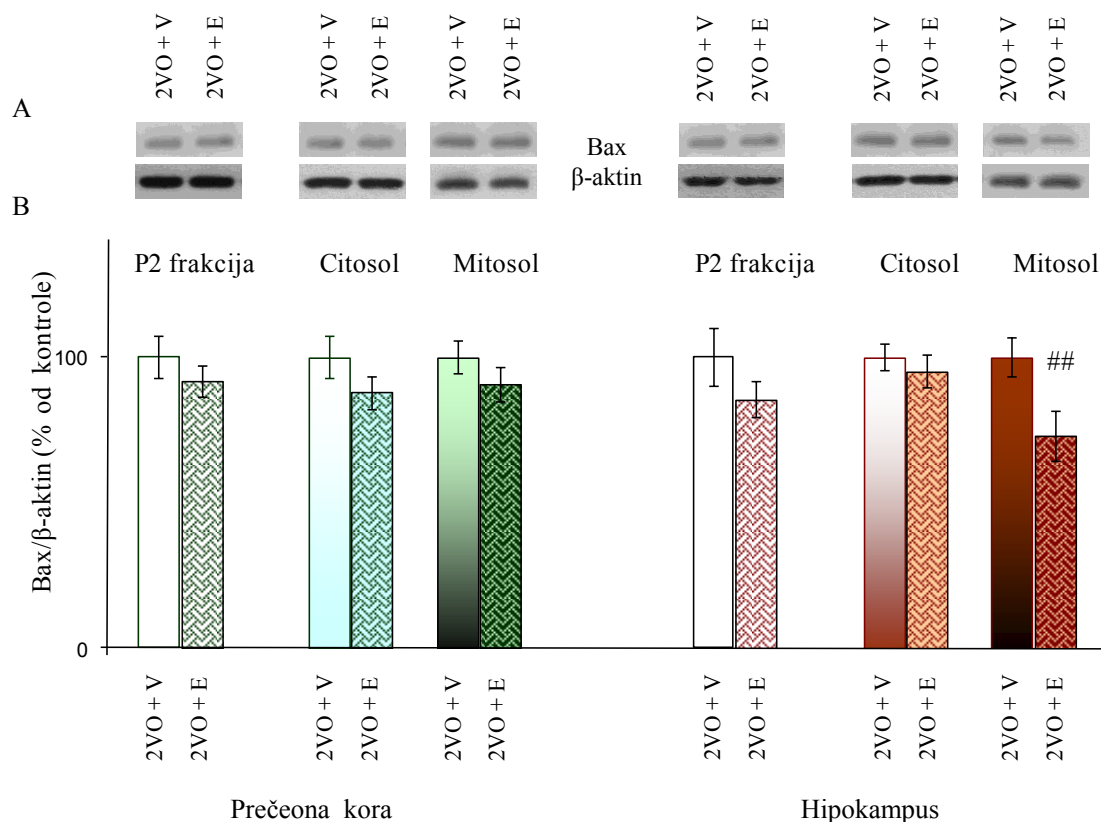
U kortikalnoj citosolnoj frakciji, ekspresija Bcl-2 proteina bila je nepromenjena (**Slika 30**), dok je nivo ispitivanog proteina bio umereno, ali statistički značajno povećan u mitohondrijskoj frakciji (124.74 ± 4.71 , $p < 0.05$, **Slika 30**). Kao što je prikazano na **Slici 30** ispitivanjem subćelijske distribucije Bcl-2 proteina u Hipp pokazano je da E dovodi do povećanja nivoa ovog proteina u mitohondrijskoj frakciji (131.84 ± 3.03 , $p < 0.01$).



Slika 30. *Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju Bcl-2 proteina u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za Bcl-2 protein (A) u P2, citosolnoj i mitosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bcl-2 iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u prečeaonoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) i ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.*

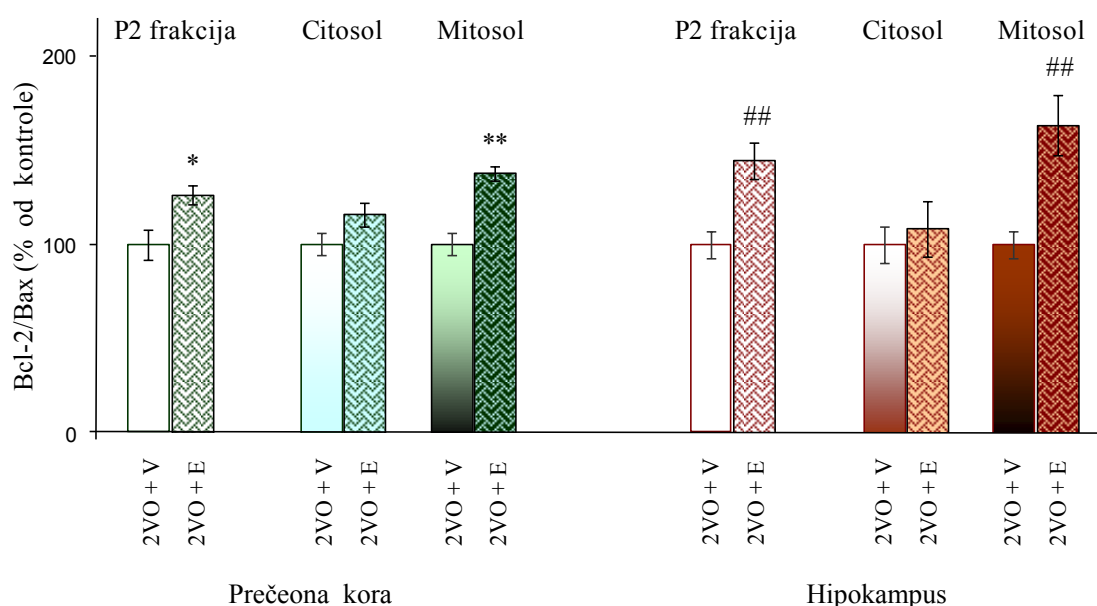
U obe ispitivane moždane strukture, u P2 frakciji, kao i u citosolnoj frakciji, ekspresija Bax proteina nije bila statistički značajno promenjena nakon E tretmana (**Slika 29**). U

mitohondrijskoj frakciji Pfc, njegova koncentracija je bila nepromenjena, dok je u Hipp bila statistički značajno smanjena ($p < 0.01$, **Slika 31**).



Slika 31. *Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju Bax proteina u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za Bax protein (A) u P2, citosolnoj i mitosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za Bax iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.*

Direktno upoređivanje nivoa Bcl-2 i Bax proteina u P2 frakcijama Pfc i Hipp ukazuje da hroničan E tretman dovodi do statistički značajnog povećanja odnosa Bcl-2/Bax proteina, što pomera ovu fino regulisanu ravnotežu ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 (126.73 ± 4.94 , $p < 0.05$ u prečeaonoj kori, odnosno 144.56 ± 9.98 , $p < 0.01$ u hipokampusu, **Slika 30**). U mitohondrijskoj subćelijskoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa nakon E hroničnog tretmana u stanju nametnute moždane hipoperfuzije, odnos Bcl-2/Bax proteina je statistički značajno povećan i pomeren ka anti-apoptotskom molekulu Bcl-2 ($p < 0.01$, **Slika 32**).

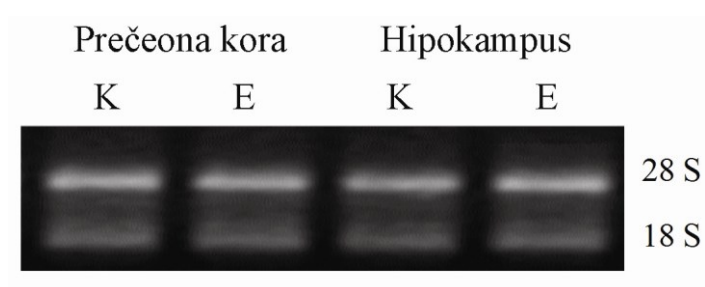


Slika 32. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na relativan odnos Bcl-2/Bax proteina u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Kvantifikacija relativnog odnosa Bcl-2/Bax proteina u P2, citosolnoj i mitosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa kod kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Vrednosti dobijene iz dva nezavisna eksperimenta predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) i ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u prečeaonoj kori; ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.

Efekat hroničnog E tretmana u regulaciji genske ekspresije praćen je merenjem nivoa iRNK za Bcl-2 i Bax u Pfc i Hipp.

Izabrani geni su uključeni u regulaciju stimulusom posredovanih aktivnosti centralnog nervnog sistema, odnosno, produkti ovih gena su neophodni za kontrolu i regulaciju ekspresije proteina koji podstiču ili usporavaju procese preživljavanja i/ili apoptoze u ćelijama nervnog sistema na nivou mitohondrija (Meffert i Baltimore, 2005).

Kvalitet i integritet ukupne RNK je analiziran na agaroznom gelu (**Slika 33**); u svakom uzorku su uočljive 28 S i 18 S subjedinice koje odgovaraju ribozomskoj RNK.

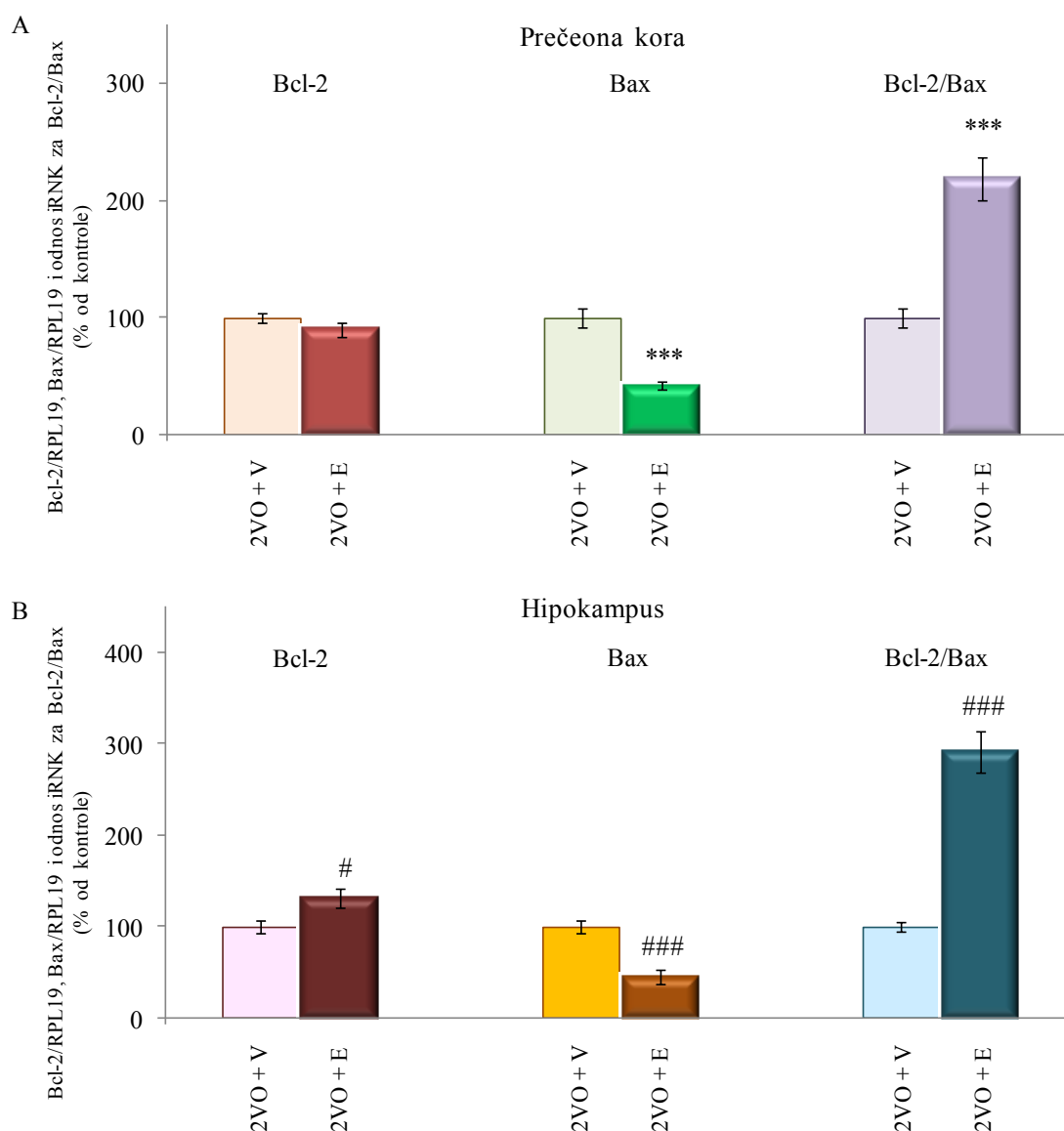


Slika 33. Provera kvaliteta i integriteta ukupne izolovane RNK. Agarozna elektroforeza ukupne RNK (5 μ g po uzorku) izolovanih iz prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Označene su pozicije 28 S i 18 S subjediniice ribozomalnih RNK.

U zadatim eksperimentalnim uslovima, svi ispitivani geni su konstitutivno eksprimirani u obe moždane strukture kod 2VO pacova tretiranih uljem.

U poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom životinja, u prečeaonoj kori, hroničan E tretman nije uzrokovao promenu ekspresije gena za Bcl-2 (**Slika 34A**) ali je značajno smanjio ekspresiju gena za Bax ($p < 0.001$, **Slika 34A**). Nivo ekspresije iRNK za Bcl-2 u stanju nametnute moždane hipoperfuzije je bio značajno povećan nakon završetka hroničnog E tretmana u hipokampusu ($p < 0.05$, **Slika 34B**), dok je ekspresija gena za Bax u istoj moždanoj strukturi bila statistički značajno smanjena ($p < 0.001$, **Slika 34B**).

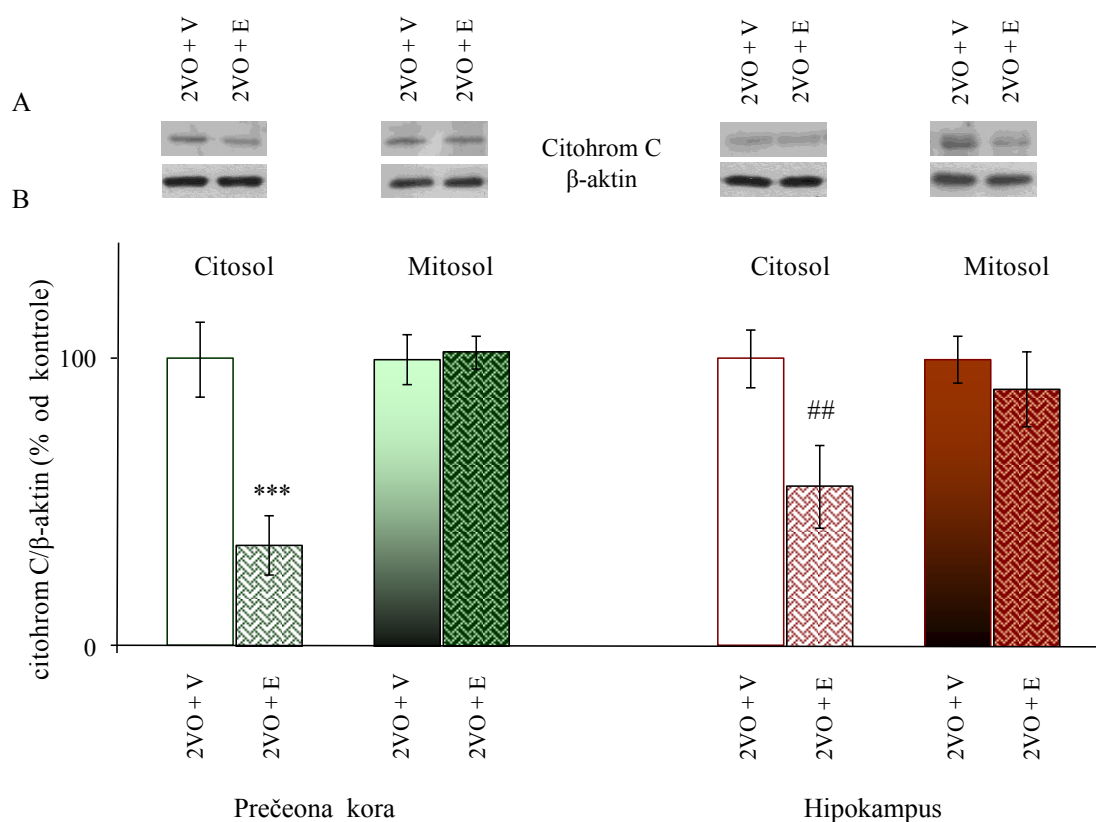
Kao što je pokazano na **Slici 34A, B**, odnos iRNK za anti- i pro-apoptotske molekule Bcl-2 familije je značajno povećan u obe ispitivane moždane strukture ($p < 0.001$).



Slika 34. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju gena za Bcl-2 i Bax u prečeaonoj kori i hipokampusu pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Kvantifikacija genske ekspresije za Bcl-2 i Bax, kao i odnos Bcl-2/Bax iRNK u prečeaonoj kori (A) i hipokampusu (B) kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih E2 (2VO+E). Dobijene vrednosti predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražene kao procenat od odgovarajuće kontrole. Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u prečeaonoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) i ### označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u hipokampusu.

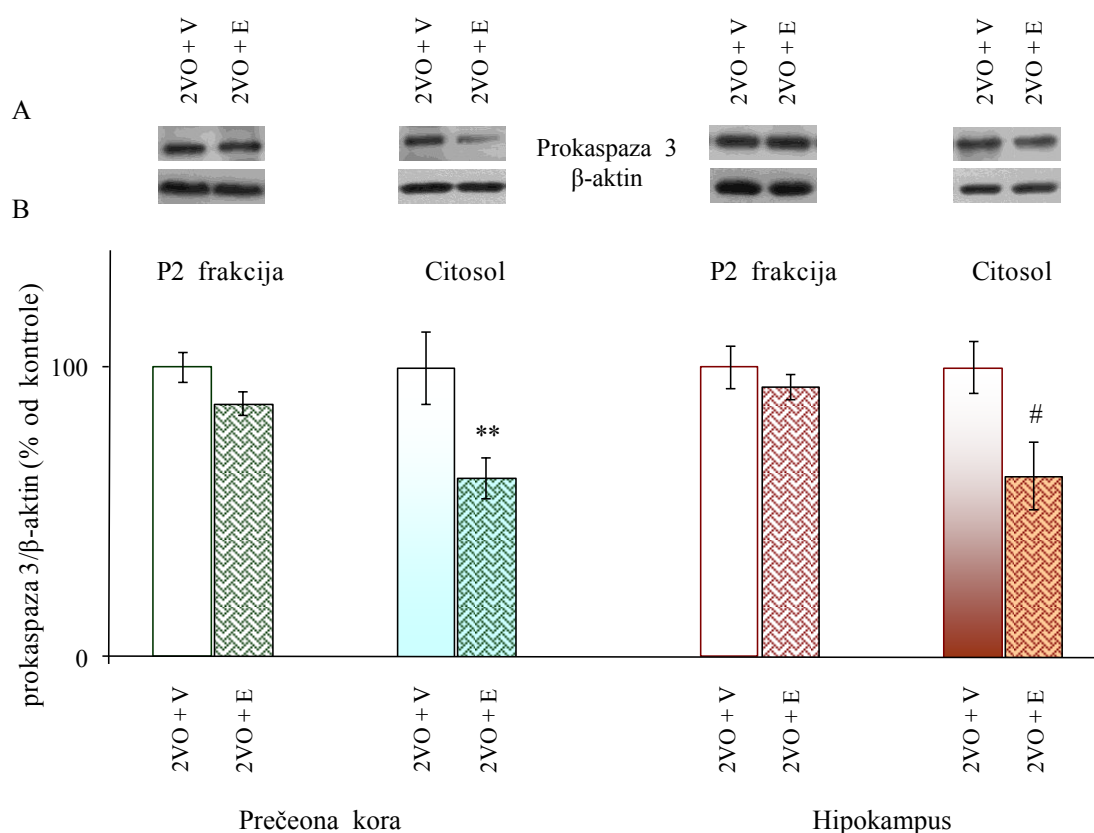
5.4. Efekat tretmana estradiolom na subćelijsku distribucija pro-apoptotskih enzima– citohroma c, prokaspaze 3, sečene kaspaze 3 i PARP u prečenoj kori i hipokampusu u stanju hronične moždane hipoperfuzije

U Pfc nakon E tretmana sadržaj citohrom C proteina bio je statistički značajno smanjen u citosolnoj frakciji ($p < 0.001$, **Slika 35**) u odnosu na 2VO grupu tretiranu uljem, dok je u mitohondrijskoj frakciji bio nepromenjen (**Slika 35**). U Hipp uočen je isti obrazac ekspresije ispitivanog proteina ($p < 0.01$, **Slika 35**).

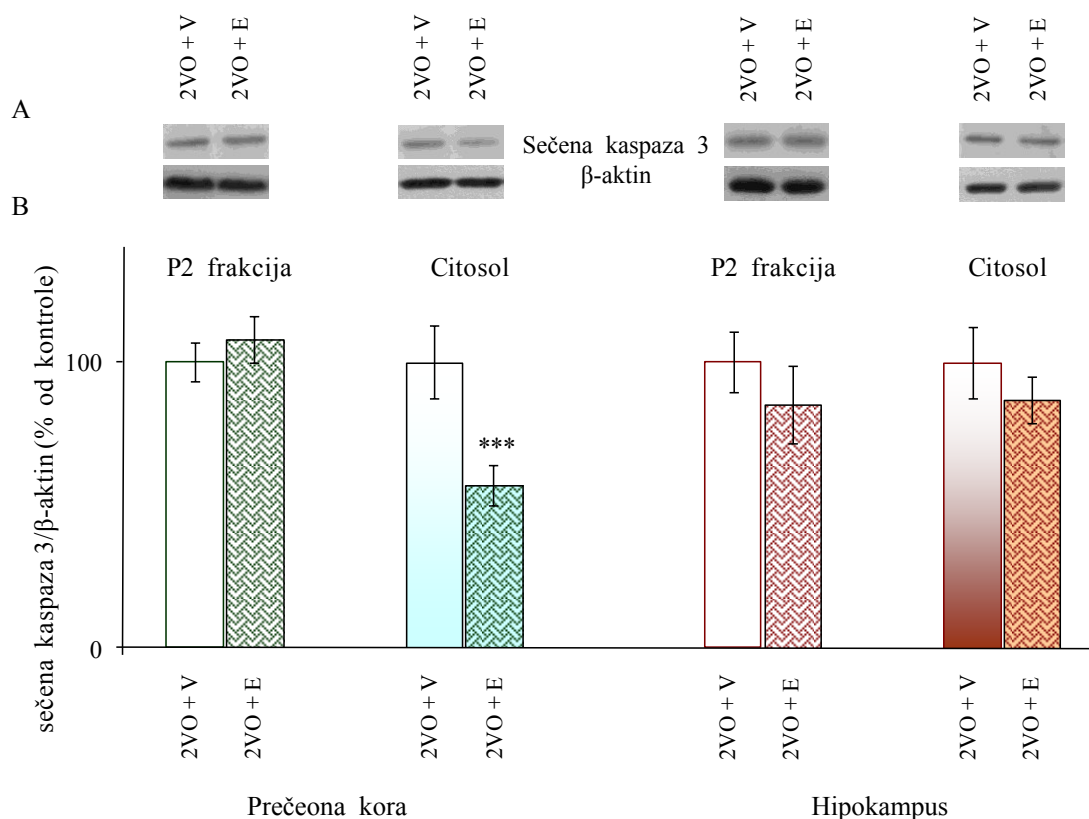


Slika 35. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju citohrom C proteina u subćelijskim frakcijama prečene kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprerativni imunoblotovi za citohrom C (A) u citosolnoj i mitosolnoj frakciji prečene kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije citohroma C iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u prečenoj kori; ## označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u hipokampusu.

U zadatim eksperimentalnim uslovima, koncentracija prokaspaze 3 (**Slika 36A, B**) i sečene kaspaze 3 (**Slika 37A, B**) bila je nepromenjena u P2 frakcijama izolovanim iz Pfc i Hipp pacova podvrgnutih trajnom podvezivanju zajedničkih karotidnih arterija nakon hroničnog E tretmana. Ukupna koncentracija prokaspaze 3 je bila statistički značajno smanjena u citosolu obe moždane strukture (61.86 ± 7.19 , $p < 0.01$ u Pfc, odnosno 72.66 ± 11.59 , $p < 0.05$ u Hipp, **Slika 36A, B**), dok je ekspresija sečene kaspaze 3 bila statistički značajno smanjenja u citosolu Pfc (57.02 ± 6.82 , $p < 0.01$, **Slika 37A, B**) i nepromenjena u citosolu Hipp (86.88 ± 8.22 , **Slika 37A, B**).



Slika 36. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju prokaspaze 3 u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusu pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za prokaspazu 3 (A) u P2 i citosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusu kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za prokaspazu 3 iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u prečeaonoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u hipokampusu.

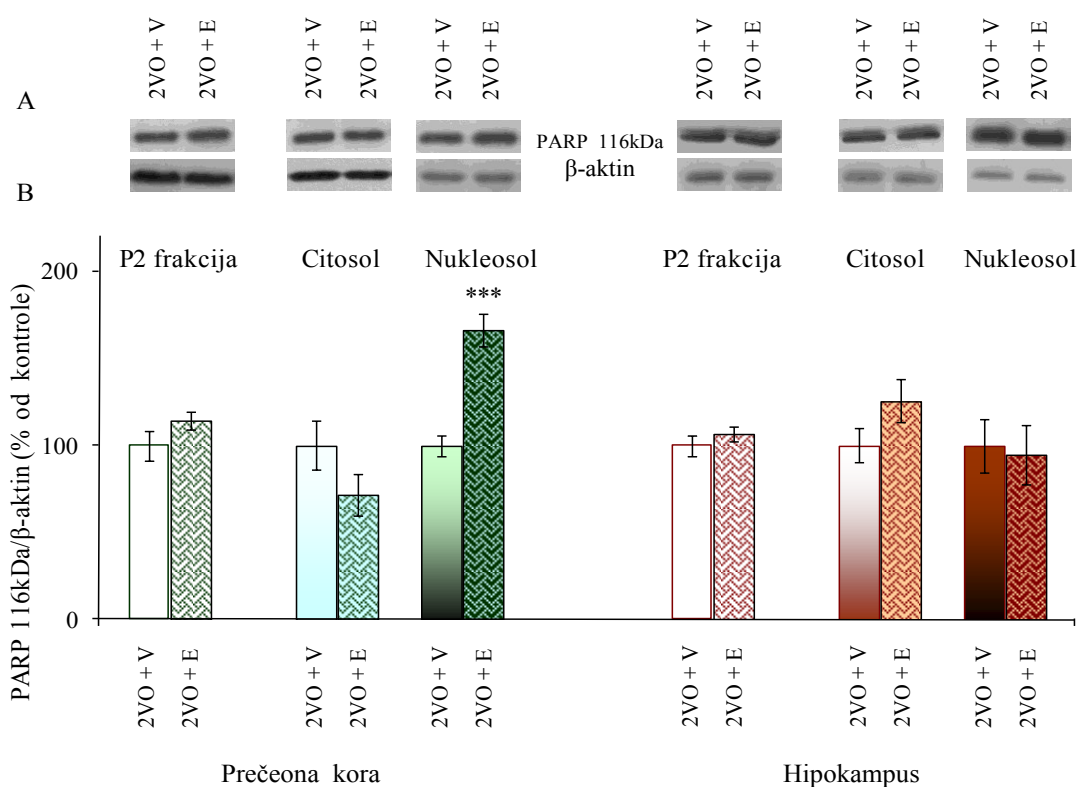


Slika 37. *Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju sečene kaspaze 3 u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za sečenu kaspazu 3 (A) u P2 i citosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za sečenu kaspazu 3 iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost ± SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u prečeaonoj kori.*

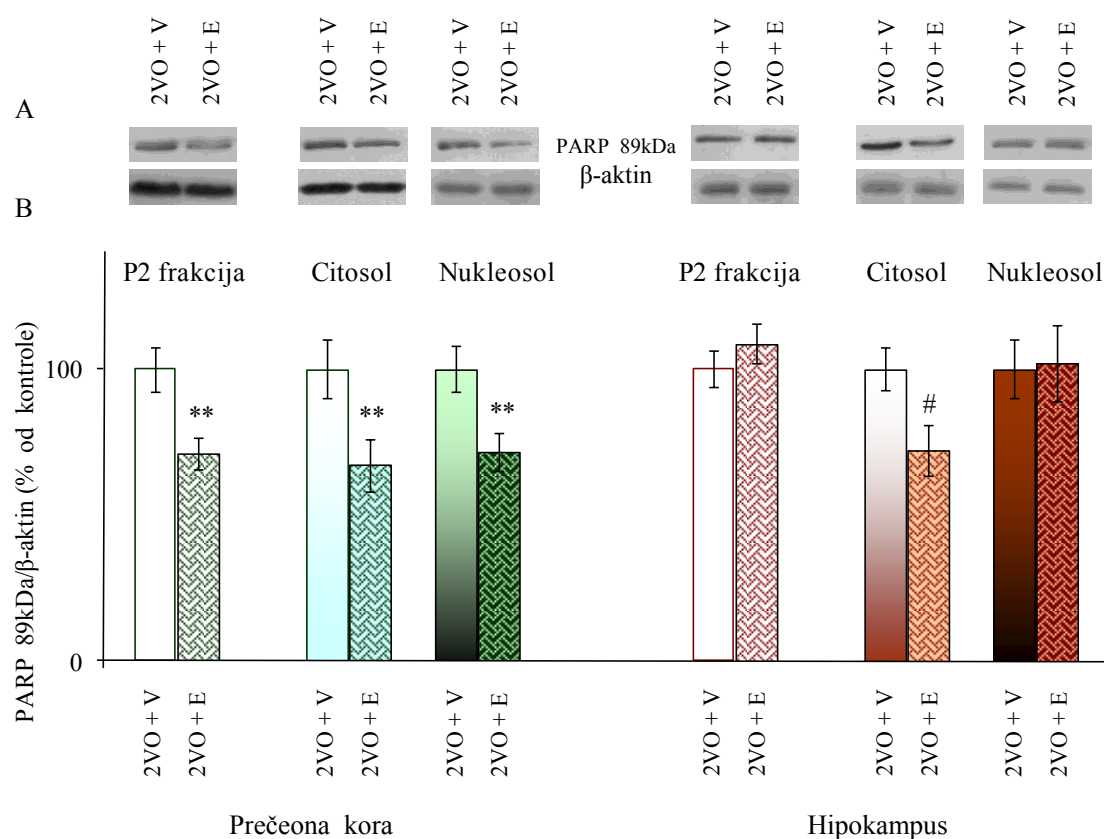
U P2 frakcijama izolovanim iz Pfc i Hipp životinja sa trajno podvezanim zajedničkim karotidnim arterijama, ekspresija celovitog PARP nepromenjena je nakon hroničnog E tretmana (**Slika 38A, B**). U poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom, u istoj ispitivanoj ćelijskoj frakciji, sadržaj velikog sečenog fragmenta PARP (89 kDa) statistički je značajno smanjen u Pfc ($p < 0.01$, **Slika 39A, B**) nakon E tretmana, dok je u Hipp njegova ekspresija bila nepromenjena (**Slika 39A, B**).

U ovoj doktorskoj disertaciji je takođe ispitivana i subćelijska distribucija PARP proteina nakon hroničnog E tretmana u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. U pogledu celokupnog PARP proteina u citosolnoj frakciji Pfc i Hipp ANOVA nije pokazala statistički značajnu razliku između analiziranih grupa, dok je u jedarnoj frakciji Pfc uočeno povećanje sadržaja celovitog PARP ($p < 0.001$, **Slika 38A, B**).

U zadatim eksperimentalnim uslovima, u citosolnoj frakciji Pfc ekspresija sečenog velikog fragmenta PARP bila je statistički značajno smanjena ($p < 0.01$, **Slika 39A, B**), isti obrazac je uočen i u Hipp ($p < 0.05$, **Slika 39A, B**). U odnosu na odgovarajuće kontrolne jedinice, kod 2VO životinja tretiranih estradiolom, u jedarnoj frakciji detektovano je smanjenje koncentracije ispitivanog proteina u Pfc ($p < 0.01$, **Slika 39A, B**), dok je u Hipp bila nepromenjena (**Slika 39A, B**).



Slika 38. Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju celovitog PARP proteina u subćelijskim frakcijama prečeaone kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za PARP protein (A) u P2, citosolnoj i nukleosolnoj frakciji prečeaone kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za celokupni PARP iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike određivane su testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; *** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.001$) u prečeaonoj kori.



Slika 39. *Efekat hroničnog tretmana estradiolom na ekspresiju sečenog fragmenta PARP proteina u subćelijskim frakcijama prečione kore i hipokampusa pacova u stanju nametnute moždane hipoperfuzije. Reprezentativni imunoblotovi za sečeni fragment PARP proteina (A) u P2, citosolnoj i nukleosolnoj frakciji prečione kore i hipokampusa kontrolne grupe životinja (2VO+V) i pacova tretiranih estradiolom (2VO+E). Kvantifikacija proteinske ekspresije za sečeni PARP iz dva nezavisna eksperimenta predstavljena je kao srednja vrednost $\pm$ SEM i izražena kao procenat od odgovarajuće kontrole (B). Statistički značajne razlike su određivane testovima one way ANOVA i post hoc Tukey; ** označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.01$) u prečionoj kori; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p < 0.05$) u hipokampusu.*

DISKUSIJA

Smanjenje protoka krvi kroz mozak i time narušeno snabdevanje nervnog tkiva kiseonikom i glukozom, jedan je glavnih uzroka ili faktora nastanka neurodegenerativnih procesa, kognitivne disfunkcije i brojnih neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (Farkas i saradnici, 2007). Stoga se promene izazvane narušavanjem moždane cirkulacije, što inače odlikuje starije osobe i pacijente obolele od Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, staračke i vaskularne demencije, izučavaju na modelu trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija pacova, čime se postiže stanje umerenog i dugotrajnog smanjenja protoka krvi kroz mozak.

Brojne kliničke studije i bazična istraživanja ukazuju da moždane strukture ispoljavaju različiti stepen osetljivosti na promene protoka krvi kroz mozak. Pokazano je su kora prednjeg mozga i hipokampus strukture osetljive na moždanu hipoperfuziju, te brže stradaju usled nedostatka kiseonika, ATP i drugih nutritijenata (Farkas i saradnici, 2007; Stewart, 1987).

Estradiol reguliše sinaptičku plastičnost, sprečava apoptozu, povećava vijabilnost ćelija i njihovu proliferaciju u *in vivo* i *in vitro* uslovima, odnosno ispoljava neuroprotektivne efekte aktiviranjem različitih genomskih, negenomskih i anti-oksidativnih mehanizama (Garcia-Segura i saradnici, 2001). Međutim, primećeno je da ovaj hormon, uprkos svojoj širokoj primeni u kliničkoj praksi, ispoljava i niz negativnih efekata kao što su oštećenje jetre, kardiovaskularnog sistema, ginektomastija, atrofija testisa, depresija i agresivno ponašanje.

S obzirom na to da su kod ljudi kora prednjeg mozga i hipokampus moždane strukture direktno uključene u regulaciju svih nervnih delatnosti, od regulacije HHA i HHG ose, preko procesa učenja i pamćenja, rasuđivanja, percepcije, motorike cilj ove doktorske disertacije bio je da se ispita efekat moždane hipoperfuzije na složenu kaskadu apoptotskih signalnih puteva u navedenim moždanim strukturama odraslih mužjaka pacova, imajući u vidu upravo njihovu veliku osetljivost na smanjenje protoka krvi. Navedeni efekti praćeni su u modelu podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija, u različitim vremenskim tačkama nakon ove intervencije. Takođe je u istom modelu sistemu ispitan uticaj hroničnog (ponovljenog) tretmana estradiolom na apoptotske puteve u ćelijama kore prednjeg mozga i hipokampusa u stanju nametnute hronične moždane hipoperfuzije.

1. Moždana hipoperfuzija, stopa preživljavanja i promene sistemskih parametara

Jedna od najlakših tehnika za izazivanje globalne moždane ishemije kod eksperimentalnih životinja je 2VO model (Farkas i saradnici, 2007). Rezultati brojnih studija ukazuju na visoku stopu smrtnosti jedinki u navedenim uslovima koja zavisi od starosti, vrste i soja (Tanaka i saradnici, 1999; Ni i saradnici, 1994; Karpiak i saradnici, 1987; Fujishima i saradnici, 1976; Ogata i saradnici, 1976; Payan i saradnici, 1965). Za mlade adultne Wistar pacove pokazano je da je stopa smrtnosti između 19.2 % i 29 % (Kumar i saradnici, 2011; Liu i saradnici, 2005; Hirabayashi i saradnici, 2001), dok je kod Sprague-Dawley iste starosti, smrtnost bila oko 7 % (Kumar i saradnici, 2006; Sopala i saradnici, 2001). Ni i saradnici (1994) uočili su da stopa preživljavanja raste sa starošću. Kod pacova starosti 7 nedelja, koji su podvrgnuti trajnom 2VO, smrtnost je bila oko 71 % u prvih 24 sata nakon operacije, dok se procenat smanjio na 10 % kod jedinki starih 13 i više nedelja. U eksperimentalnim uslovima koji su zadati u ovoj doktorskoj disertaciji, korišćeni su mužjaci Wistar soja starosti 3 meseca. Stopa smrtnosti nakon 2VO je bila oko 13 %, pri čemu je najveći broj životinja umirao u vremenskom periodu od 12–24 sata posle operacije. Nakon ovog vremenskog intervala smrtnost značajno opada, što je u skladu sa rezultatima studija drugih autora (Tanaka i saradnici, 1999; Ni i saradnici, 1994; Fujishima i saradnici, 1976; Ogata i saradnici, 1976; Payan i saradnici, 1965). Kod životinja podvrgnutih lažnoj operaciji u našim eksperimentima, uočena je manja smrtnost, koja se može pripisati neželjenom dejstvu anestezije i/ili mehaničkim oštećenjima vagusa prouzrokovanim manipulacijom u toku primenjene procedure.

U prvom i drugom danu nakon operacije uočeno je smanjenje telesne mase i kod lažno operisanih i 2VO životinja, što se može pripisati oštećenjima mišića vratnog regiona (sternohiodni i sternomastoidni mišići) koja nastaju kao posledica hirurške intervencije. Ova oštećenja uzrokuju nelagodu pri pokretanju glave, gutanju i žvakanju (Farkas i saradnici, 2007). U kasnijim vremenskim tačkama je pokazano da lažno operisane jedinke brzo nadoknađuju izgublenu težinu, dok usporeno povećanje telesne mase kod 2VO životinja može biti posledica povećanja tonusa simpatičke inervacije, promena koncentracije hormona ili narušavanja autonomne regulacije i krvotoka kroz hipotalamus (Otori i saradnici, 2003; Tsuchiya i saradnici, 1992). To su pokazali i rezultati prezentovani u ovoj doktorskoj disertaciji. U PD 3 i PD 7, zapažen je značajan

gubitak telesne mase u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na početnu, mada nisu uočene razlike u masi između lažno operisanih i 2VO životinja. U najkasnijoj proučavanoj vremenskoj tački, PD 90, zabeleženo je povećanje mase svih jedinki u odnosu na početnu dok je uočena razlika u težini između lažno-operisanih i 2VO životinja bila manja.

Osim smanjene stope preživljavanja i promena u telesnoj masi koji su praćeni u ovoj studiji, rezultati brojnih istraživanja su pokazali da se usled trajnog podvezivanja zajedničkih karotidnih arterija pokreće sistemski inflamatorni odgovor i drastično smanjuje protok krvi u karotidnom sinusu gde baroreceptori neprekidno kontrolišu krvni pritisak (Farkas i saradnici, 2007). Iznenadno smanjenje krvnog pritiska, najverovatnije narušavajući koncentraciju vazopresina (Dreifuss i saradnici, 1976; Clark i Silva, 1967), kateholamina, angiotenzina (Brassard i Yamaguchi, 1989; Hodge i saradnici, 1966), ali i kortikosterona (Farkas i saradnici, 2002), pokreće kardiovaskularni barorefleks, povećava tonus simpatičke inervacije i pokreće hipertenzivni odgovor koji za uzvrat povećava krvni pritisak i srčanu frekvenciju (Wang i saradnici, 1970; Krieger i saradnici, 1963).

Pokazano je da je krvno-moždana barijera kod starih i osoba obolelih od Alchajmerove bolesti, veoma osetljiva na stanje ishemije, i da stiče propustljivost za velike molekule (Farkas i saradnici, 2007; Lenzser i saradnici, 2005; Preston i Foster, 1997; Wisniewski i saradnici, 1997; Schlageter i saradnici, 1987). Tako se tokom starenja i u stanju demencije kod ljudi (Farkas i Luiten, 2001) menja struktura, odnosno, debljina krvno-moždane barijere, dolazi do distorzije moždanih mikrovaskularnih sudova, smanjenja njihovog dijametra (de la Torre, 2000; Shi i saradnici, 2000) i broja glutamatnih transportera, nagomilavanja kolagenih vlakana u mikrovaskularnoj osnovi membrane, čime se narušava transport nutritijenata poput glukoze, holina i esencijalnih aminokiselina, a time i fina regulacija regionalnog protoka krvi u pojasnoj kori (Farkas i saradnici, 2000), kao i u beloj masi čeonog i potiljačnog režnja (Farkas i saradnici, 2006a,b). Elektronska mikroskopija ukazala je na postojanje ovih promena i kod starih pacova i pacova podvrgnutih 2VO (De Jong i saradnici, 1999; De Jong i saradnici, 1990), pogotovu u hipokampusu, ali i u ostalim moždanim strukturama uključenim u procese učenja i pamćenja. Uočene promene mogu, između ostalog, doprineti pojavi neurodegeneracije koja je detektovana u eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovoj doktorskoj disertaciji.

Treba istaći da promene moždane cirkulacije kod 2VO pacova ne odgovaraju u potpunosti stepenu moždane hipoperfuzije kod ljudi detektovanom u kliničkim studijama. Uočeno je smanjenje moždane cirkulacije od 6 % u temenom i slepoočnom regionu velikog mozga kod starijih osoba u odnosu na mlade (Claus i saradnici, 1998). U hipokampusu i istim regionima kore velikog mozga kod obolelih od Alchajmerove bolesti u poređenju sa zdravim kontrolama iste starosti to smanjenje je oko 27 % (Farkas i Luiten, 2001) i ne menja se tokom vremena. Sa druge strane, kod 2VO pacova, primećeno je da protok krvi drastično opada odmah nakon podvezivanja karotidnih arterija i da se tokom narednih meseci postepeno normalizuje putem adaptivnih i kompenzatornih mehanizama (Farkas i saradnici, 2007), što ukazuje na relativno dug, ali ograničen period, tokom kog moždana hipoperfuzija kod 2VO životinja odgovara onoj uočenoj kod ljudi.

2. Uloga moždane hipoperfuzije u neurodegenerativnim promenama

U stanju ishemije javljaju se dva tipa ćelijske smrti neurona, nekroza i apoptoza, čija pojava zavisi od mnogih faktora, između ostalog tipa, dužine trajanja, mesta i intenziteta nametnute ishemije (Harukuni i Bhardwaj, 2006). Takođe, pretpostavlja se da tip ćelijske smrti zavisi i od unutarćelijske koncentracije ATP, pri čemu se apoptoza odvija u prisustvu, a nekroza u odsustvu ovog supstrata (Ueda i Fujita, 2004). Brojni literaturni podaci ukazuju da je nekroza, najverovatnije dominantan način umiranja ćelija tokom akutne faze, dok je za odloženu ćelijsku smrt, koja se javlja kasnije, karakteristična apoptoza (Bennett i saradnici, 1998).

U zadatim eksperimentalnim uslovima, difenilaminski DNK fragmentacioni esej, koji se koristi za određivanje količine fragmentisane DNK nastale u prisustvu pro-apoptotskih stimulusa, pokazao je vremenski zavisnu pojavu apoptoze u obe ispitivane moždane strukture. Kod 2VO životinja, korišćenjem specifične fluorescentne boje *Fluoro-Jade B*, ali i *Hoechst* bojenjem, utvrđen je isti trend promene, odnosno detektovano je povećanje broja specifično obojenih ćelija. Tako je u kori prednjeg mozga u PD 3 uočen umeren dok je u PD 7 detektovan znatan stepen apoptoze. Za razliku od kore prednjeg mozga, apoptoza u hipokampusu opažena je tek 7 dana nakon nametanja stanja moždane hipoperfuzije. Ovi rezultati nisu iznenađujući, s obzirom na to da je u istim vremenskim tačkama uočen specifičan trend promena proteinske ekspresije pro- i anti-apoptotskih

molekula (prokaspaze 3, sečene kaspaze 3, PARP i članova Bcl-2 familije) za koje se smatra da mogu biti odgovorni za odvijanje neurodegenerativnih procesa. Takođe, treba istaći da su dobijeni rezultati u skladu sa istraživanjima na drugim modelima ishemije u kojima je uočena rana pojava neurodegeneracije u moždanoj kori i prugastom telu (Guiliarno i saradnici, 2013), i odložena apoptotska smrt u hipokampusu, koja između ostalog može nastati kao posledica hronične, oligemijske faze moždane hipoperfuzije i dugotrajnog smanjenja protoka krvi kroz mozak. Mnoge studije ukazuju da se prve neurodegenerativne promene piramidalnih neurona u CA1 sloju hipokampusa pacova javljaju nakon prve nedelje, a da se broj povećava u CA1 i CA3 sloju nakon 2 nedelje i da dalje raste u funkciji vremena (Farkas i saradnici, 2007, Liu i saradnici, 2006; Ohtaki i saradnici, 2006; Schmidt-Kastner i saradnici, 2001).

Treba istaći da u ni u jednoj od dve ispitivane moždane strukture nisu detektovane neurodegenerativne promene u PD 90, što se može objasniti aktiviranjem kompenzatornih i adaptivnih mehanizama, koji omogućavaju postepenu restituciju protoka krvi kroz mozak na preoperativni nivo. Ove promene se postižu aktiviranjem neoštećenih kapilara, uspostavljenjem normalne biohemijske regulacije protoka krvi povećanjem oslobađanja različitih trofičkih faktora i NO koji izazivaju vazodilataciju i neoangiogenezu (Farkas i saradnici, 2007; Ohtaki i saradnici, 2006; de Wilde i saradnici, 2002). Ovi podaci ukazuju na pojavu dinamičnog remodelovanja mikrocirkulacije koji doprinose promenama protoka krvi zahvaljujući delovanju faktora rasta i drugih faktora koji stimulišu angiogenezu, ali dovode i do prilagođavanja kapilarne mreže.

U različitim modelima ishemije, najuočljivije promene uočene su na neuronima i to na nivou ćelijskog tela i sinaptičkih kontakata (Kumar i saradnici, 2011; Farkas i saradnici, 2007). Pretpostavlja se da promene na nivou dendrita mogu nastati, između ostalog, i usled narušavanja proteinske i genske ekspresije MAP-2 (eng. *Microtubule-Associated Protein 2*), fosfoproteina u mikrotubulama dendrita, a odgovoran je za granjanje i plastičnost (Dawson i Hallenbeck, 1996; Friedrich i Aszodi, 1991), kao i sinaptofizina, proteina koji se specifično eksprimira na membrani sinaptičkih vezikula (Thiel, 1993). Uočene promene se ogledaju u progresivnom gubitku dendrita u periodu od 4. do 20. nedelje ishemije i u smanjenju uspešnosti na testovima ponašanja i memorije (Liu i saradnici, 2005), što ukazuje da moždana hipoperfuzija remeti veze unutar neuronskih

kola i komunikaciju između neurona, doprinoseći kognitivnom deficitu (Farkas i saradnici, 2007).

Osim specifičnih promena na neuronima, u stanju moždane hipoperfuzije zabeleženo je pokretanje reaktivne astroglioze praćeno specifičnim procesima hipertrofije i proliferacije (Panickar i Norenberg, 2005). Astrocitoza i vremenski-zavisan odgovor astrocita u stanju nametnute moždane hipoperfuzije variraju u različitim delovima mozga. Prvi znaci aktivacije astrocita zapažaju se u kori i optičkim putevima u prvih nekoliko dana, dok se pojačanje ekspresije GFAP (eng. *glial fibrillary acidic protein*) u hipokampusu uočava kasnije, čak i u odsustvu smrti neurona (Vicente i saradnici, 2009; Maragakis i Rothstein, 2006; Schmidt-Kastner i saradnici, 2005; Farkas i saradnici, 2004; Pappas i saradnici, 1996).

3. Vremenski profil apoptotske signalizacije u kori prednjeg mozga i hipokampusu u nakon nametanja stanja moždane hipoperfuzije

Kao što je već pomenuto, neuroni centralnog nervnog sistema mogu umreti usled akutnih, teških povreda izazvanih mehaničkim oštećenjima, moždanim udarom, zaustavljanjem rada srca, ali i usled progresivnih bolesti koje se javljaju u starijem životnom dobu, poput amiotrofne lateralne skleroze, dugotrajne moždane hipoperfuzije i Alchajmerove bolesti. Iako se 2VO model već dugi niz godina koristi za proučavanje promena koje nastaju kao posledica smanjenja protoka krvi, vremenski profil ćelijske smrti i promena ekspresije apoptotskih molekula u kori prednjeg mozga i hipokampalnim membranskim frakcijama, kao i manifestacije ovih biohemijskih promena na nivou samih neurona, nisu jasno definisane.

Poznato je da neurodegenerativne promene mogu biti posledica aktivacije unutrašnjeg, odnosno, mitohondrijskog puta apoptoze (Love, 2003), u kome su ključni pro- i anti-apoptotski proteini Bcl-2 familije (Adams i Cory, 1998; Clark i saradnici, 1997; Oltvai i saradnici, 1993). Ovi molekuli svoju ulogu ostvaruju regulacijom integriteta membrane mitohondrija, dok njihov relativni odnos deluje kao reostat kojim je kontrolisano da li će ćelija krenuti putem apoptoze ili ne (Korsmeyer i saradnici, 1993). Bcl-2 protein, tzv. faktor ćelijskog preživljavanja, inhibira ćelijsku smrt sprečavanjem aktivacije kaspaza, smanjenjem nivoa slobodnih radikala, regulacijom koncentracije Ca^{2+} (MacManus i Linnik, 1997), i/ili inhibiranjem pro-apoptotske aktivnosti drugih članova Bcl-2

familije, poput Bax, Bcl-xs i Bad (Merry i Korsmeyer, 1997). Sa druge strane, Bax protein, tzv. faktor ćelijske smrti, podstiče promene mitohondrijskih funkcija tako što učestvuje u formiranju pora, oslobađanju CytC i drugih pro-apoptotskih faktora iz mitohondrija (Gross i saradnici, 1998). Rezultati mnogobrojnih studija ukazuju da moždana ishemija menja ekspresiju molekula Bcl-2 familije u celokupnim ćelijskim ekstraktima i ćelijskim subfrakcijama glijskih ćelija i neurona, kao i da ovi proteini mogu biti ključni u određivanju sudbine ćelije u ovom modelu (Ouyang i Giffard, 2004; Graham i saradnici, 2000). Uočeno je, na primer, da ishemija značajno povećava nivo Bax proteina i istovremeno dovodi do pojave apoptoze, dok se smanjenje količine Bcl-2 molekula može povezati sa težinom ishemične povrede (Krajewski i saradnici, 1995). Osim toga, pokazano je da se nivo iRNK za Bcl-2 i Bcl-xl smanjuje u CA1 sloju hipokampusa, što može biti povezano sa povećanom degeneracijom piramidnih ćelija 72 sata nakon nametanja stanja ishemije (Chen i saradnici, 1997). U istim eksperimentalnim uslovima genska i proteinska ekspresija Bax proteina, povećava se u ishemijom-ugroženim i neugroženim regionima mozga (Chen i saradnici, 1996).

Iako promena ekspresije Bcl-2 familije proteina u membranskim frakcijama u uslovima umerene, trajne globalne moždane ishemije nije bila predmet prethodnih istraživanja, uočeni profili promene ekspresije ovih molekula nisu iznenađujući. Ono što predstavlja novinu ove studije, osim sinaptosomalnog vremenski-zavisnog, je tkivno-specifičan odgovor. U gruboj membranskoj frakciji kore prednjeg mozga u PD 3 i PD 7, uočeno je smanjenje ekspresije Bcl-2 i povećanje ekspresije Bax proteina, povećana fragmentacija DNK i broj ćelija u apoptozi, dok je u PD 90 nivo ispitivanih proteina i stepen neurodegeneracije bio isti kao i kod lažno operisanih kontrola. Uz sve navedeno, relativan odnos nivoa Bcl-2 i Bax ukazuje da u PD 3 i PD 7, 2VO dovodi do pomeranja ravnoteže ka pro-apoptotskom molekulu Bax, dok je u PD 90 ovaj odnos bio uporediv sa kontrolom. Uočene promene proteinske ekspresije ukazuju na moguću uključenost ispitivanih proteina u pro-apoptotske procese u gruboj membranskoj frakciji u samoj pojavi neurodegeneracije u kori prednjeg mozga.

Vremenski profil ekspresije Bcl-2 proteina u hipokampusu bio je identičan kao u kori prednjeg mozga, dok je povećanje ekspresije Bax proteina, kao i promenjen odnos ispitivanih proteina u korist Bax-a, detektovan samo u PD 7. U ovoj moždanoj strukturi smanjenje nivoa Bcl-2, nepromenjen profil ekspresije Bax proteina i odsustvo promene Bcl-2/Bax odnosa u prvoj ispitivanoj vremenskoj tački nagoveštavaju pojavu

vremenski-zavisnog i tkivno-specifičnog odgovora pojedinih članova Bcl-2 familije, ali i da ispitivani molekuli prisutni u gruboj membranskoj frakciji mogu biti uključeni u razvoj neurodegenerativnih promena koje se uočavaju tek u kasnijoj, odnosno hroničnoj fazi moždane hipoperfuzije. U PD 7, osim modulacija ekspresije ispitivanih članova Bcl-2 familije, uočene su povećana fragmentacija DNK i broj apoptotskih ćelija. Dobijeni rezultati ukazuju na pojavu odložene ćelijske smrti u ovoj moždanoj strukturi, što je dobijeno i u ranijim studijama (Kirino, 1982). Naime, studije na drugim modelima ishemije pokazale su da se u hipokampusu i još nekim moždanim strukturama navedeni fenomen javlja u periodu od 3 do 7 dana nakon nametanja ishemije, tokom koga se najverovatnije odvijaju pripreme za ulazak ćelije u apoptozu, aktiviraju se specifični procesi koji dovode do skupljanja ćelije, kondenzacije hromatina, piknoze jedra, pupljenja ćelijske membrane i dr (Krajewski i saradnici, 1995; Dux i saradnici, 1992; Kawai i saradnici, 1992), što kao krajnji ishod ima odumiranje ćelije.

Pored članova Bcl-2 familije, centralno mesto u apoptotskim procesima mogu imati i pripadnici familije kaspaza, čije auto-katalitičko sazrevanje i kaskada međusobne aktivacije dovode, na kraju, do aktivacije kaspaze 3, egzekutornog proteina apoptoze. Aktivacija i selektivna proteoliza proteina prokaspaze 3 i velikog broja supstrata kaspaze 3, smatra se presudnim događajem i poslednjom prekretnicom nakon koje ćelija kreće „putem bez povratka” (Broughton i saradnici, 2009).

Stoga je, u zadatom eksperimentalnom modelu ispitana ekspresija prokaspaze 3 i fragmenta molekulske težine 17 kDa, koji nastaje njenom aktivacijom. Dobijeni rezultati pokazuju da u obe ispitivane strukture u PD 3 i PD 7 dolazi do povećanja ekspresije proenzima kaspaze 3 i njene aktivne forme, dok je u PD 90 ekspresija obe forme bila ostale nepromenjena. Slični rezultati dobijeni su i u studijama na drugim modelima ishemije i drugim subćelijskim frakcijama. Naime, povećana ekspresija iRNK za prokaspazu 3 detektovana je nakon fokalne i globalne moždane ishemije kod pacova (Schultz i saradnici, 1999; Ni i saradnici, 1998, 1997). Nakon nametanja trajnih bilateralnih okluzija u periodu od 1–3 dana primećeno je povećanje količine iRNK (Tomimoto i saradnici, 2003), dok je povećana proteinska ekspresija uočena u intervalu od 1–30 dana (Tomimoto i saradnici, 2003). Takođe, mnoge studije na MCAO modelu ukazuju na vremenski-zavisan profil ekspresije ispitivanih proteina. Imunohistohemijsko bojenje ishemičnih mozgova odraslih pacova pokazalo je da se povećanje prokaspaze 3 u kori, prugastom telu, talamusu i hipokampusu može uočiti

već nakon 30 minuta, da je najizraženije u vremenskom periodu 12–24 sata i da je povećanje prisutno i 4 dana nakon nametanja povrede (Krupinski i saradnici, 2000). Praćenjem prisustva aktivne kaspaze 3 imunohistohemijskim bojenjem Velier i saradnici (1999) su pokazali da se slabo bojenje javlja 6 sati nakon operacije, a da se nakon 24 sata detektuje veliki broj klastera u kori koji je prisutan i kasnije, u toku 5 dana. Didenko i saradnici (2002) uočili su povećanje ekspresije 6 sati posle podvezivanja desne srednje aorte, najveću ekspresiju 24 sata i dalje vidljivo bojenje nakon 72 sata. Detektovane razlike u ekspresiji i aktivaciji kaspaze 3 su minimalne i najverovatnije zavise od tipa okluzije, ali i od primenjenih tehnika detekcije.

Imajući u vidu promene apoptotskih signala detektovane u našim eksperimentalnim uslovima nameće se pitanje vezano za promene u hipokampusu uočene u PD 3. Naime, kako se mogu objasniti dva naizgled oprečna rezultata– nepromenjen relativni odnos Bcl-2/Bax i mali broj ćelija u apoptozi s jedne strane, i povećanje ekspresije proenzimske i aktivirane forme kaspaze 3 u istoj vremenskoj tački, s druge? S obzirom na ulogu kaspaze 3 u ćelijskoj smrti, može se pretpostaviti da tokom akutne faze moždane hipoperfuzije, prisustvo ovog proteina ne utiče na direktnu i trenutnu tranziciju iz modula preživljavanja u modul programirane ćelijske smrti, te se može pretpostaviti da aktivnost kaspaze 3 doprinosi brojnim morfološkim promenama koje predstavljaju svojevrsnu postepenu pripremu ćelije za otpočinjanje procesa apoptoze koja se uočava u kasnijim fazama ishemije (Hymani Yuan, 2012), kao na primer, učestvovanje u remodelovanju citoskeleta, izrastanju aksona i dr (Villapol i saradnici, 2008; McLaughlin, 2004). Takođe, treba istaći da mnoge studije ukazuju da je kaspaza 3 jedan od glavnih biološki senzora za odumiranje ćelije, ali ne sme se isključiti mogućnost da je ovaj protein i jedini predstavnik ove velike familije koji učestvuje u pojavi apoptoze koja je posredovana ishemijom (Martin i Green, 1995).

Poslednjih godina identifikovan je veliki broj supstrata kaspaze 3, poput prokaspaza, članova Bcl-2 familije, PARP, proteina citoskeleta kao što su aktin i spektrin, protein kinaza, prekursora za amiloidni protein, presenlina (Yang i saradnici, 2004; Kim i saradnici, 2003; Barnes i saradnici, 1998; Mashima i saradnici, 1997). Poznato je da proteoliza nekih supstrata kaspaze 3 direktno doprinosi biološkim i morfološkim promenama koje su u direktnoj vezi sa apoptozom (degradacija jedra i pupljenje membrane), dok razgradnja drugih dovodi do modifikovanja funkcija različitih ćelijskih sistema koji dalje mogu doprineti pojavi apoptotskih promena (Ca^{2+} influks i

mitohondrijske funkcije). Kao što je već pomenuto, jedan od supstrata kaspaze 3 je i PARP, protein koji produkcijom PAR lanaca ostvaruje ulogu u reparaciji DNK, ali i u programiranoj ćelijskoj smrti (Oliver i saradnici, 1998). Pod dejstvom kaspaze 3, njegovom proteolizom nastaju dve neaktivne subjedinice molekulske težine 89 kDa i 24 kDa, koje su pokazatelji inicijacije programa apoptotske ćelijske smrti (Chaitanya i saradnici, 2010a,b). Stoga je, kao refleksija aktivacije kaspaze 3, praćen nivo degradacije PARP, odnosno, nivo proteinske ekspresije celovitog PARP i njegovog velikog neaktivnog sečenog fragmenta molekulske težine 89 kDa. Povećanje nivoa sečene forme PARP koje je detektovano u kori u PD 3 i PD 7, kao i u hipokampusu u PD 7, može se objasniti porastom ekspresije aktivirane kaspaze 3 i ulaskom ćelije u apoptozu. Interesantan rezultat predstavlja povećanje ekspresije celovitog PARP hipokampusu u PD 7, koji bi se mogao biti posledica povećane genske i proteinske ekspresije ovog proteina u uslovima ishemije, što je predhodno pokazano (Chiang i Lam, 2000; Liu i saradnici, 2000). Naime, moguće je da ćelije pokušavaju da kompenzuju oštećenja DNK izazvana ishemijom povećanjem ekspresije PARP i povećanim stvaranjem i vezivanjem PAR lanaca. S druge strane, imajući u vidu ulogu PARP u programiranoj ćelijskoj smrti, može se pretpostaviti da je u uslovima ishemije ovaj protein značajan potrošač ATP, te da prekomerna produkcija PAR lanaca dovodi do nepovoljnog energetskog bilansa u ćeliji i stoga promoviše apoptozu (Endres i saradnici, 1997), što može biti uzrok uočenog regionalno-specifičnog odgovora. Uzimajući u obzir činjenicu da se u hipokampusu u uslovima nametnute moždane hipoperfuzije javlja vremenski odložena ćelijska smrt, ali i znatno veća oštećenja u poređenju sa korom prednjeg mozga (Farkas i saradnici, 2007), može se pretpostaviti da se promena ekspresije ispitivanog proteina prevashodno povezuje sa promovisanjem procesa programirane ćelijske smrti, a ne sa protekcijom ćelije.

* * *

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da se u kori prednjeg mozga u akutnoj (PD 3) i hroničnoj fazi (PD 7) moždane hipoperfuzije uočavaju promene, koje vode kako neurodegenerativnim promenama, tako i apoptozi pokrenutoj unutrašnjim mitohondrijskim putem, dok se u hipokampusu u akutnoj fazi uočavaju umerene neurodegenerativne promene, a izražena apoptotoza uočava se samo u hroničnoj fazi

moždane hipoperfuzije. U fazi oporavka, usled postepene restitucije protoka krvi kroz mozak i reparacionih mehanizama, ove promene odsustvuju.

Nesporo je da ispitivani pro- i anti-apoptotski molekuli ispoljavaju vremenski zavisnu ulogu u nastanku neurodegenerativnih promena u stanju nametnute moždane hipoperfuzije u obe moždane strukture, stoga bi poseban akcenat trebalo staviti na dalje definisanje uloge ovih molekula i oblikovanje specifičnih terapijskih pristupa uključenih u oporavak moždanog tkiva u uslovima hronične moždane hipoperfuzije.

4. Neurodegeneracija i apoptotska signalizacija u mozgu odraslih pacova u uslovima hronične hipoperfuzije nakon tretmana estradiolom

U klasičnom smislu, estradiol je reproduktivni hormon koji deluje na HHG, ali i na HHA osu. Ovaj steroidni hormon i njegovi metaboliti mogu imati „nereproduktivnu” ulogu i ispoljiti neurotrofičke i neuroprotektivne efekte (Brann i saradnici, 2007) i zato se nazivaju neuroaktivnim steroidima (Li i saradnici, 2013). Iako se prvobitno smatralo da se pomenuti efekti estradiola javljaju isključivo tokom razvika i u ranom neonatalnom periodu, kada podspešuje rast neurita, gustinu trnića i broj sinapsi, danas je poznato da se pomenuti efekti javljaju i u odraslom dobu (Wise i Dubal, 2000).

Brojne kliničke i epidemološke studije ukazuju da ovaj hormon utiče na formiranje memorije, kogniciju, raspoloženje, smanjuje incidencu i progresiju mnogih bolesti poput multiple skleroze, osteoporoze, epilepsije, kao i kardiovaskularnih oboljenja. U različitim *in vivo* i *in vitro* modelima pokazano je da estradiol povećava vijabilnost, preživljavanje i diferencijaciju neurona hipokampusa, bademastih jedara i kore, kao i da podspešuje regenerativne procese, sinaptičku transmisiju i neurogenezu, sprečava smrt ćelija podstaknutu oksidativnim stresom, mehaničkim oštećenjima, različitim toksinima i stimulusima, kao što je elementarno gvožđe ili prooksidativni hemoglobin, glutamat, AMPA, NMDA, kainat, natrijum-azid i vodonik peroksid (Li i saradnici, 2013, 2009; Simpkins i saradnici, 2009; Garcia-Segura i saradnici, 2001; Wise i Dubal, 2000).

Neke studije ukazuju da se neuroprotektivni efekti estradiola nakon povrede mozga mogu selektivno uočiti u kori, hipokampusu i prugastom telu, dok su drugi regioni mozga manje osetljivi, kako na nametnute povrede, tako i na delovanje ovog hormona. Takođe, uočeno je da estradiol u nekim slučajevima može ispoljiti negativne efekte, odnosno uzrokovati neurotoksične efekte u zdravim neuronima i glijskim ćelijama ili

čak dodatno povećati oštećenja. Ovakve promene se najverovatnije javljaju kao posledica aktiviranja pro-oksidativnih mehanizama (Strom i saradnici, 2013; Khodabandehloo i saradnici, 2013). Kakav će efekat ostvariti zavisi od primenjene doze, dostignutog nivoa u plazmi, ozbiljnosti povrede i dužine trajanja ishemije (Perez-Alvarez i saradnici, 2012), kao i od starosti jedinke, pola, soja i slično (Garcia-Segura i saradnici, 2001).

Neuroprotektivni efekti estradiola mogu biti periferni i lokalni. Periferni efekti podrazumevaju regulaciju metabolizma i kardiovaskularnog sistema, čiji hormoni i/ili drugi signalni molekuli doprinose vazodilataciji krvnih sudova i prokrvljenosti mozga, čime štite neurone i glijske ćelije od oštećenja. Poznato je da pre-tretman estradiolom štiti ćelije mozga od povreda/oštećenja nastalih ishemijom poboljšavajući moždanu cirkulaciju, stimulišući signalnu kaskadu koja dovodi do aktivacije endotelne NOS i nastanka NO, koji ispoljava snažno vazodilatatorno dejstvo. To povećava prokrvljenost ka i od povređenih regiona u kritičnom periodu nakon nametanja moždane hipoperfuzije (McNeill i saradnici, 1999), smanjuje energetske deficit i povećava eliminaciju nastalih toksičnih faktora u ovom stanju (Durham i saradnici, 2012). S druge strane, lokalni efekti se odnose na komponente nervnog sistema, mada mogu biti različiti na nivou neurona, glijskih ćelija i drugih ćelija nervnog sistema.

U centralnom nervnom sistemu estradiol ispoljava anti-oksidativna svojstva; reguliše gensku transkripciju nakon vezivanja za odgovarajuće jedarne i membranske ER, ali i neke druge do danas neidentifikovane receptore; aktivira anti-apoptotske unutarćelijske signalne puteve fosforilacijom pojedinih proteina poput proteina G, transkripcionog faktora CREB (eng. *cAMP response element binding protein*) i signalne kaskade MAPK i Akt (Simpkins i saradnici, 2009); kontroliše ekspresiju i aktivaciju anti- i pro-apoptotskih proteina; stupa u interakcije sa sekundarnim glasnicima; modifikuje glutamatnu signalizaciju; reguliše unutarćelijsku homeostazu Ca^{2+} i dr (Garcia-Segura i saradnici, 2001). Na taj način estradiol ispoljava spore i genske efekte, kao i brze negenomske efekte, čime utiče na nadražljivost neurona i sinaptičku transmisiju (Moss i Gu, 1998).

Brojne studije ukazuju da estradiol direktno ili indirektno može dovesti do preživljavanja u mnogim ćelijama, uključujući i neurone (Garcia-Segura i saradnici, 2001, Singer i saradnici, 1998, Garcia-Segura i saradnici, 1998, Gollapudi i Oblinger,

1999a,b), tako što reguliše ekspresiju članova Bcl-2 familije (Huang i saradnici, 1997; Kandouz i saradnici, 1996; Teixeira i saradnici, 1995).

U uslovima nametnute moždane ishemije uočeno je da fiziološke koncentracije estradiola smanjuju obim ćelijske smrti, održavaju nepromenjeni nivo ekspresije Bcl-2 molekula i povećavaju nivo ekspresije estrogenskog receptora ER β u odnosu na ER α (Won i saradnici, 2006). Detektovani efekti najvećim delom se ostvaruju posredstvom direktnog delovanja estradiola na Bcl-2 i Bcl-xl gene, budući da oba gena u svojim regulatornim domenima sadrže višestruke sekvence za vezivanje kompleksa ER-estradiol (Simpkins i saradnici, 2009; Won i saradnici, 2006; Dubal i saradnici, 1999; Garcia-Segura i saradnici, 1998). Sa druge strane, estradiol ostvaruje i indirektan efekat, smanjujući nivo ekspresije Nip2 proteina, koji deluje kao negativni regulator transkripcije Bcl-2 gena, što opet deluje u smislu povećanja ekspresije Bcl-2 (Simpkins i saradnici, 2009; Garcia-Segura i saradnici, 2001). U eksperimentalnim uslovima zadatim u ovoj doktorskoj disertaciji, interesantna je činjenica da je u prečenoj kori količina Bcl-2 proteina povećana u mitohondrijskoj frakciji što nedvosmisleno ukazuje na povećanje njegove ukupne količine u ćeliji, ali i na njegovu translokaciju u mitohondrije gde najverovatnije sprečava otvaranje pora, oslobađanje pro-apoptotskih molekula i reguliše nivo unutarćelijskog Ca²⁺. Won i saradnici (2006) su uočili da se u uslovima nametnute ishemije koncentracija Bcl-2 molekula u kori prednjeg mozga značajno smanjuje što je dobijeno i u ovoj studiji, dok estradiol sprečava povredom-posredovano smanjenje nivoa ovog proteina. Autori dobijene rezultate objašnjavaju aktiviranjem ER β koji je veoma eksprimiran u adultnoj kori, ali i povećanjem koncentracije i aktiviranjem ER α koji je inače slabo prisutan u zdravom adultnom mozgu (Dubal i saradnici, 1999).

U hipokampusu je uočeno povećanje nivoa Bcl-2 iRNK u gruboj membranskoj frakciji i povećanje nivoa Bcl-2 proteina u gruboj membranskoj i mitohondrijskoj frakciji. Imajući u vidu da Bcl-2 svoju funkciju ostvaruje na mitohondrijama i da je njegova ekspresija modulirana estradiolom (Krajewska i saradnici, 1997) povećanje ekspresije i njegova translokacija u mitohondrije, kao i porast ekspresije ne iznenađuje. Dobijeni rezultat za ekspresiju Bcl-2 molekula može biti posledica osetljivosti ovog ćelijskog regiona na dejstvo malih doza estradiola koji može propagirati anti-apoptotske signale, omogućavajući lakše, ponovno, uspostavljanje ishemijom narušenih sinaptičkih kontakata i podspešujući ćelijsko preživljavanje (Wappler i saradnici, 2011). Na osnovu

dobijenih rezultata nameće se pitanje zašto promena ekspresije Bcl-2 proteina u gruboj membranskoj frakciji odsustvuje u prečenoj kori. Odgovor može ležati u činjenici da su usled veće osetljivosti hipokampusa na stanje moždane hipoperfuzije, promene u količini Bcl-2 proteina pre aplikacije estradiola bile znatnije, što je uzrokovalo i kvantitativno veće promene nakon tretmana. Takođe, moguće je da je, usled prisustva većeg broja/različitih vrsta receptora ili na drugi način uzrokovanoj osetljivosti prema estradiolu, hipokampus podložniji efektima ovog hormona.

Podaci dobijeni u ovoj studiju ukazuju da tretman estradiolom uspeva da kompenzuje inicijalni porast nivoa Bax proteina u mitohondrijskoj frakciji hipokampusa, dok je promena ekspresije ovog proteina izostala u svim ispitivanim subćelijskim frakcijama prečene kore. Sa druge strane, ekspresija iRNK za Bax smanjena je u obe moždane strukture u stanju nametnute hronične moždane hipoperfuzije nakon ponovljenog tretmana estradiolom, što ukazuje da ovaj neurosteroid ispoljava genomski efekat, ali i da direktno i/ili indirektno dovodi do promene proteinske ekspresije u hipokampusu. Sličan trend genske i proteinske ekspresije Bax proteina uočili su i Won i saradnici (2006), mada su oni pratili promene u drugačijem modelu ishemije.

S obzirom na to da se nivo ekspresije pojedinačnih članova Bcl-2 familije ne može smatrati pouzdanim pokazateljem da li će ćelija započeti sa programom ćelijske smrti ili ne, kao precizniji parametar koristi se njihov kvantitativni odnos. U zadatim eksperimentalnim uslovima, promenjen odnos ispitivanih članova Bcl-2 familije u korist Bcl-2 proteina uočen je u gruboj membranskoj i mitohondrijskoj frakciji obe moždane strukture, što ukazuje da tretman malim dozama estradiola može imati pozitivan uticaj na ćelijsko preživljavanje, iako ne mora direktno regulisati ekspresiju pojedinačnih molekula. Podsticanje anti-apoptotske i suprimiranje pro-apoptotske signalizacije ovim hormonom u okviru mitohondrijskog, unutrašnjeg puta apoptoze, pokazano je i u studijama u kojima su ispitivani drugi tipovi moždane ishemije (Simpkins i saradnici, 2009; Won i saradnici, 2006).

Pokazano je da estradiol direktno i/ili indirektno sprečava otvaranje permeabilnih tranzicionih pora i oslobađanje CytC, reguliše količine Ca^{2+} , razgradnju ATP i stvaranje ROS (Simpkins i saradnici, 2009), čime se smanjuje aktivacija pro-apoptotske signalne kaskade, odnosno aktivacija kaspaze i ćelijska apoptoza (Bagetta i saradnici, 2004). Da bi se utvrdilo da li ponovljeni tretman fiziološkim dozama estradiola u stanju hronične moždane hipoperfuzije dovodi do promene ekspresije CytC u prečenoj kori i

hipokampusu, praćena je promena nivoa ekspresije ispitivanog proteina u različitim ćelijskim frakcijama. Utvrđeno je da tretman malim dozama estradiola značajno smanjuje ekspresiju CytC u citosolu obe moždane strukture, što se slaže sa nalazima drugih autora (Simpkins i saradnici, 2009; Bagetta i saradnici, 2004). Takođe, treba istaći da dobijeni rezultat za CytC prati promene u ekspresiji članova Bcl-2 familije, međusobni odnos ovih proteina koji je pomeren u smeru anti-apoptotskog proteina Bcl-2, kao i smanjenje neurodegenerativnih pojava.

U zadatim eksperimentalnim uslovima, uočeno je smanjenje nivoa prokaspaze 3 u citosolnoj frakciji obe moždane strukture, kao i smanjenje ekspresije kaspaze 3 u citosolu prečione kore, što se podudara sa ekspresijom ostalih ispitivanih proteina u ovoj studiji. Scibnick i saradnici (2004), uočili su da 10 nM estradiol u primarnoj kulturi neurona kore prednjeg mozga, sprečava odvijanje apoptotskih procesa tako što smanjuje početno povećanje kalpaina, pomera Bcl-2/Bax odnos ka Bcl-2 i smanjuje aktivaciju kaspaze 3.

Imajući u vidu ranije pokazana neuroprotektivna svojstva estradiola, odsustvo promene ekspresije ispitivanih proteina u gruboj membranskoj frakciji obe moždane strukture donekle je iznenađujuće. S obzirom na to da se promene koje nastaju kao posledica ishemije u nervnim završecima obično prvo uočavaju, bilo bi za očekivati da će se i modulacija ekspresije ovih proteina nakon tretmana estradiolom detektovati u ovim regionima. Na osnovu dobijenih rezultata, može se pretpostaviti da se osetljivost nervnih završetaka ne odnosi samo na početna stanja ishemije, već i na kasnije faze, i da se zbog toga pro-apoptotske promene zadržavaju duže ili su za njihovo otklanjanje potrebne veće doze estradiola, drugačiji tip aplikacije i/ili vreme. Sa druge strane, odsustvo promene ekspresije kaspaze 3 u gruboj membranskoj frakciji obe moždane strukture i citosolnoj frakciji hipokampusa može se objasniti i time da kaspaza 3 ima ulogu i u remodelaciji citoskeleta i drugim procesima kojima se smanjuje intenzitet pro-apoptotskih promena (Snigdha i saradnici, 2012), te se odsustvo smanjenja njene ekspresije ne mora nužno protumačiti kao izostanak neuroprotektivne uloge estradiola.

Dobijeni rezultati ukazuju da tretman estradiolom dovodi do povećanja ekspresije celovitog PARP i to samo u jedarnoj frakciji prečione kore, gde ovaj protein može ostvarivati svoju neuroprotektivnu ulogu, što je u skladu sa istraživanjima drugih autora (Zhang i saradnici, 2013). U navedenoj studiji, pokazano je da estradiol povećava aktivnost PARP, tako što pospešuje njegovu translokaciju u jedro i stimuliše vezivanje

za ER α , čime se menja ekspresija gena koji su pod kontrolom ER α -estradiol kompleksa. Sa druge strane, u modelu primenjenom u ovoj doktorskoj disertaciji, estradiol nije doveo do promene ekspresije celovitog PARP u hipokampusu, što se može smatrati regionalno-specifičnim odgovorom uslovljenim stepenom oštećenja uzrokovanog ishemijom, i/ili posledičnom aktivacijom signalnih puteva u ispitivanim moždanim strukturama. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je u hipokampusu predominantno eksprimiran ER β koji se heterodimerizuje sa ER α i negativno reguliše gensku ekspresiju (Bean i saradnici, 2014). Takođe, pokazano je da ishemija može dovesti do povećanja ekspresije ER α , smanjenja ekspresije ER β , kao i da estradiol svoje neuroprotektivno dejstvo ostvaruje uglavnom preko ER α . Ekspresija PARP fragmenta od 89 kDa u prečenoj kori bila je smanjena u sve tri ispitivane subćeljske frakcije, što se može dovesti u vezu sa smanjenjem ekspresije kaspaze 3 u citosolu. Sa druge strane, smanjenje ekspresije sečenog PARP, uz odsustvo promene ekspresija kaspaze 3, u gruboj membranskoj frakciji može biti i posledica modulacije funkcije same kaspaze 3. Dok je promena u ekspresiji sečene forme PARP u hipokampusu bila primetna samo u citosolu gde je tretman estradiolom najverovatnije doveo do povećanja stabilnosti PARP proteina. Takođe, dobijeni rezultat može se objasniti mogućnošću da aktivna forma kaspaze 3 nakon tretmana estradiolom efekte ostvaruje na drugim supstratima koji su uključeni u anti-apoptotsku signalizaciju, a ne na samom PARP proteinu.

Podaci iz literature ukazuju da estradiol u različitim modelima ishemije, direktno može delovati na nivou sinapsi, aktivirajući ćelijsku signalizaciju posredstvom sekundarnih glasnika, što dovodi do brzih negenomskih promena nadražljivosti, sinaptičke transmisije i/ili sinaptičke plastičnosti (Mattson i Duan, 1998). Podaci ukazuju da estradiol reguliše i transkripciju apoptotskih gena, poput Bcl-2, Bax, kaspaze 3, gena inflamatornog odgovora, kao što su TNF- α , Il-1 i Il-6, kao i gena za različite faktore rasta, strukturne proteine i neuropeptide (Shughrue i Merchenthaler, 2003). Navedenim akcijama estradiol smanjuje ekscitoksičnost (Herson i saradnici, 2009), inflamaciju (Herson i saradnici, 2009; Suzuki i saradnici, 2009; Stein, 2001), stabilizuje krvno moždanu barijeru (Liu i saradnici, 2005) i dr. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji za fragmentaciju DNK i *Fluoro-Jade B* bojenje, koje prate promene u ekspresiji ispitivanih apoptotskih molekula, nagoveštavaju da ponovljeni tretman fiziološkim dozama estradiola doprinosi smanjenju broja umrlih ćelija, što je potvrđeno i u drugim studijama. Naime, i drugi autori proučavajući efekte estradiola u različitim

modelima ishemije uočili su da ovaj steroidni hormon, regulišući gensku i proteinsku ekspresiju mnogih proteina u različitim subćelijskim frakcijama, može umanjiti nivo neurodegenerativnih procesa, a time, kao krajnji ishod, smanjiti broj umirućih ćelija (Wappler i saradnici, 2011, 2010; Liu i saradnici, 2009; Plahta i saradnici, 2004; Shughrue i Merchenthaler, 2003). Detektovane promene mogu biti relevantne za brojne funkcije, poput povećavanja moždane plastičnosti, pažnje, sposobnosti učenja i memorisanja, za koje je, inače, pokazano da su smanjenje u stanju nametnute moždane hipoperfuzije (Wappler i saradnici, 2010).

* * *

Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da hroničan tretman fiziološkom dozom estradiola u stanju nametnute moždane hipoperfuzije dovodi do modulacije ekspresije različitih pro- i anti-apoptotskih molekula, i pomeranja njihove fino regulisane ravnoteže ka anti-apoptotskim proteinima, čime se generalno ćelije štite od apoptoze. Uočeni efekat estradiola može biti od kliničkog značaja, imajući u vidu da stanja koja se odlikuju smanjenjem moždane cirkulacije ili njenim prolaznim prekidom dovode do brojnih neuroloških deficita, uključujući i smanjenje kognitivnih i memorijskih funkcija, promene afekta i motorike za čiju su direktnu i posrednu regulaciju upravo zadužene strukture ispitane u ovoj doktorskoj tezi.

ZAKLJUČAK

Eksperimentalni pristup i dizajn primenjen u ovoj doktorskoj tezi pružio je mogućnost boljeg razumevanja prostornih i vremenskih promena u izabranim regionima prednjeg mozga pacova, kori velikog mozga i hipokampusu, u stanju nametnute moždane hipoperfuzije, kao i nakon sedmodnevnog tretmana estradiolom.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kora prednjeg mozga i hipokampus su strukture osetljive na stanje nametnute moždane hipoperfuzije. Najizraženije promene, u smislu neurodegeneracije i apoptoze, uočavaju se 3. i 7. dana nakon nametanja hipoperfuzije, dok se do 90. dana uspostavljaju adaptivni i kompenzatorni mehanizmi, usled kojih se svi praćeni parametri vraćaju na nivo kontrole. U oba moždana regiona, hipoperfuzija izaziva znatan stepen degeneracije i ćelijske smrti neurona, počev od postoperativnog dana 3, što je ilustrovano:
 - povećanjem broja apoptotskih ćelija i stepena fragmentacije DNK;
 - povećanjem ekspresije pro-apoptotskih molekula—prokaspaze 3, sećene kaspaze 3 i PARP;
 - smanjenjem ekspresije anti-apoptotskog proteina Bcl-2 i povećanjem pro-apoptotskog proteina Bax, što uslovljava pomeranje relativnog odnosa ekspresije članova Bcl-2 familije ka pro-apoptotskim molekulima.
2. Tretman estradiolom u izabranom režimu (33.3 µg/kg/dan, 7 dana) u oba ispitana moždana regiona uslovljava:
 - a. smanjenje broja apoptotskih ćelija i DNK fragmentacije;
 - b. povećanje genske i proteinske ekspresije anti-apoptotskog molekula Bcl-2 u mitohondrijskoj frakciji; smanjenje ekspresije Bax, što zajedno sa povećanom ekspresijom Bcl-2, uslovljava pomeranje ravnoteže Bcl-2/Bax u korist anti-apoptotskih signala;
 - c. smanjenje ekspresije pro-apoptotskih proteina, prokaspaze 3 i sećene kaspaze 3 u citosolu;

- d. smanjenje nivoa oslobođenog citohroma c u citosol, uz nepromenjen nivo ovog proteina u mitohondrijskoj frakciji;
- e. povećanje nivoa celovitog PARP u jedru i smanjenje nivoa isečenog PARP u svim ispitivanim subćelijskim frakcijama.

Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da se molekulski mehanizam dejstva estradiola, osim njegovog poznatog neurotrofnog dejstva na nervne ćelije, zasniva i na specifičnoj modulaciji ekspresije apoptotskih signalnih puteva, budući da se u primenjenom modelu uočava nishodna regulacija ekspresije i/ili aktivacije anti- i pro-apoptotskih molekula mitohondrijskog puta.

Dodatna istraživanja delovanja estradiola mogla bi omogućiti razvoj novih terapijskih strategija za modulaciju odgovora specifičnih ćelija i moždanih struktura uključenih u kogniciju, formiranje memorije i učenje kod starih osoba, kao i obolelih od progresivnih neurodegenerativnih bolesti, čime bi se znatno poboljšao kvalitet njihovih života.

LITERATURA

- Abe, K., Yoshida, S., Watson, B. D., Busto, R., Kogure, K., Ginsberg, M. D. (1983) Alpha-Tocopherol and ubiquinones in rat brain subjected to decapitation ischemia. *Brain Res* 273(1), 166-9
- Adams, J. M., Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281(5381), 1322-6
- Alenzi, F. Q., Lotfy, M., Wyse, R. (2010) Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev* 11(2), 271-80
- Amaral, D. G., Lavenex, P. (2006) Hippocampal neuroanatomy. *The hippocampus book* in press Oxford UP: Oxford
- Arbelaez, A., Castillo, M., Williams, L., Armao, D. M. (1999) Vertebral hemangioendothelial sarcoma: MR findings. *J Comput Assist Tomogr* 23(6), 981-3
- Austin, P. J., Betts, M. J., Broadstock, M., O'Neill, M. J., Mitchell, S. N., Duty, S. (2010) Symptomatic and neuroprotective effects following activation of nigral group III metabotropic glutamate receptors in rodent models of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol* 160(7), 1741-53
- Bagchi, D., Carryl, O. R., Tran, M. X., Bagchi, M., Garg, A., Milnes, M. M., Williams, C. B., Balmoori, J., Bagchi, D. J., Mitra, S., Stohs, S. J. (1999) Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol Cell Biochem* 1-2, 109-16
- Bagetta, G., Chiappetta, O., Amantea, D., Iannone, M., Rotiroli, D., Costa, A., Nappi, G., Corasaniti, M. T. (2004) Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* 368(1), 87-91
- Barnes, N. Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L. M., Oppenheim, R. W., Milligan, C. E., (1998) Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J Neurosci* 18(15), 5869-80
- Bean, L. A., Ianov, L., Foster, T. C. (2014) Estrogen Receptors, the Hippocampus, and Memory. *Neuroscientist* 2014 Feb 7 [Epub ahead of print]
- Beato, M., Chávez, S., Truss, M. (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61(4), 240-51
- Beato, M., Klug, J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6(3), 225-36
- Beato, M., Truss, M., Chávez, S. (1996) Control of transcription by steroid hormones. *Ann N Y Acad Sci* 784, 93-123
- Bennett, S. A., Tenniswood, M., Chen, J. H., Davidson, C. M., Keyes, M. T., Fortin, T., Pappas, A. (1998) Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioral impairment. *NeuroReport* 9, 161-166
- Boatright, K. M., Salvesen, G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 6, 725-31
- Borghammer, P., Chakravarty, M., Jonsdottir, K. Y., Sato, N., Matsuda, H., Ito, K., Arahata, Y., Kato, T., Gjedde, A. (2010) Cortical hypometabolism and hypoperfusion in Parkinson's disease is extensive: probably even at early disease stages. *Brain Struct Funct* 214(4), 303-17

- Borghammer, P., Østergaard, K., Cumming, P., Gjedde, A., Rodell, A., Hall, N., Chakravarty, M. M. (2010) A deformation-based morphometry study of patients with early-stage Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 17(2), 314-20
- Brann, D., Raz, L., Wang, R., Vadlamudi, R., Zhang, Q. (2012) Oestrogen signalling and neuroprotection in cerebral ischaemia. *J Neuroendocrinol* 24(1), 34-47
- Brassard, M., Yamaguchi, N. (1989) Evidence that increases in circulating catecholamines of adrenal origin are not involved in pressor response to bilateral carotid occlusion in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16, 147-160
- Broughton, B. R., Reutens, D. C., Sobey, C. G. (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40(5), e331-9
- Cardona-Gomez, P., Perez, M., Avila, J., Garcia-Segura, L. M., Wandosell, F. (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 25(3), 363-73
- Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., Potier, M. (2008) Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ERalpha transcriptional activation in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110(1-2), 176-85
- Carswell, H. V., Anderson, N. H., Morton, J. J., McCulloch, J., Dominiczak, A. F., Macrae, I. M. (2000) Investigation of estrogen status and increased stroke sensitivity on cerebral blood flow after a focal ischemic insult. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(6), 931-6
- Ceulemans, A. G., Zgavc, T., Kooijman, R., Hachimi-Idrissi, S., Sarre, S., Michotte, Y. (2010) The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *J Neuroinflammation* 7, 74
- Chaitanya, G. V., Schwaninger, M., Alexander, J. S., Babu, P. P. (2010) Granzyme-b is involved in mediating post-ischemic neuronal death during focal cerebral ischemia in rat model. *Neuroscience* 165(4), 1203-16
- Chaitanya, G. V., Steven, A. J., Babu, P. P. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8, 31
- Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D. A., Simon, R. P. (1997) Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 69(1), 232-45
- Chen, J., Zhu, R. L., Nakayama, M., Kawaguchi, K., Jin, K., Stetler, R. A., Simon, R. P., Graham, S. H. (1996) Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem* 67(1), 64-71
- Chiang, S. K., Lam, T. T. (2000) Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(10), 3210-4
- Chopp, M., Chen, H., Ho, K. L., Dereski, M. O., Brown, E., Hetzel, F. W., Welch, K. M. A. (1989) Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. *Neurology* 39, 1396-1398

- Civitelli, R., Hruska, K. A., Shen, V., Avioli, L. V. (1990) Cyclic AMP-dependent and calcium-dependent signals in parathyroid hormone function. *Exp Gerontol* 25(3-4), 223-31
- Clark, B. J., Silva Jr, M. R. E. (1967) An afferent pathway for the selective release of vasopressin in response to carotid occlusion and haemorrhage in the cat. *J Physiol* 191, 529-542
- Clark, R. S., Chen, J., Watkins, S. C., Kochanek, P. M., Chen, M., Stetler, R. A., Loeffert, J. E., Graham, S. H. (1997) Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci* 17(23), 9172-82
- Claus, J. J., Breteler, M. M., Hasan, D., Krenning, E. P., Bots, M. L., Grobbee, D. E., van Swieten, J. C., van Harskamp, F., Hofman, A. (1998) Regional cerebral blood flow and cerebrovascular risk factors in the elderly population. *Neurobiol Aging* 19, 57-64
- Corcoran, G. B., Fix, L., Jones, D. P., Moslen, M. T., Nicotera, P., Oberhammer, F. A., Buttyan, R. (1994) Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 128(2), 169-81
- Cory, S., Adams, J. M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2(9), 647-56
- Crack, P., Taylor, J. (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 38, 1433-1444
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 (Pt 2), 249-68
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116(2), 205-19
- Dawson, D. A., Hallenbeck, J. M. (1996) Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 170-174
- De Jong, G. I., de Weerd, H., Schuurman, T., Traber, J., Luiten, P. G. M. (1990) Microvascular changes in aged rat forebrain. Effects of chronic nimodipine treatment. *Neurobiol Aging* 11, 381-389
- De Jong, G. I., Farkas, E., Plass, J., Keijser, J. N., de la Torre, J. C., Luiten, P. G. M. (1999) Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in hippocampus CA1 that correlates to spatial memory impairment. *Neuroscience* 91, 203-210
- de la Torre, J. C. (2000) Impaired cerebrovascular perfusion. Summary of evidence in support of its causality in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 924, 136-152
- de Wilde, M. C., Farkas, E., Gerrits, M., Kiliaan, A. J., Luiten, P. G. M. (2002) The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 947, 166-173
- Deveraux, Q. L., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1999) Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol* 19(6), 388-98

- Didenko, V. V., Ngo, H., Minchew, C. L., Boudreaux, D. J., Widmayer, M. A., Baskin, D. S. (2002) Caspase-3-dependent and -independent apoptosis in focal brain ischemia. *Mol Med* 8(7), 347-52
- Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33(7), 637-68
- Donovan, M., Cotter, T. G. (2004) Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta* 2-3, 133-47
- Doyle, K. P., Simon, R. P., Stenzel-Poore, M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55, 310-318
- Drakulić, D., Veličković, N., Stanojlović, M., Grković, I., Mitrović, N., Lavrnja, I., Horvat, A. (2013) Low-dose dexamethasone treatment promotes pro-survival signalling pathway in adult rat prefrontal cortex. *J Neuroendocrinol* doi: 10.1111/jne.12037.
- Dreifuss, J. J., Harris, M. C., Tribollet, E. (1976) Excitation of phasically firing hypothalamic supraoptic neurones by carotid occlusion in rats. *J Physiol* 257, 337-354
- Drevets, W. C. (2000) Neuroimaging studies of mood disorders. *Biol Psychiatry* 8, 813-29
- Driscoll, I., Hamilton, D. A., Yeo, R. A., Brooks, W. M., Sutherland, R. J. (2005) Virtual navigation in humans: the impact of age, sex, and hormones on place learning. *Horm Behav* 47(3), 326-35
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102(1), 33-42
- Dubal, D. B., Shughrue, P. J., Wilson, M. E., Merchenthaler, I., Wise, P. M. (1999) Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19(15), 6385-93
- Dubal, D. B., Wilson, M. E., Wise, P. M. (1999) Estradiol: a protective and trophic factor in the brain. *J Alzheimers Dis* 1(4-5), 265-74
- Durham, J. L., Jordan, K. A., Devos, M. J., Williams, E. K., Sandstrom, N. J. (2012) Estradiol protects against hippocampal damage and impairments in fear conditioning resulting from transient global ischemia in mice. *Brain Res* 1443, 64-74
- Dux, E., Schubert, P., Kreutzberg, G. W. (1992) Ultrastructural localization of calcium in ischemic hippocampal slices: the influence of adenosine and theophylline. *J Cereb Blood Flow Metab* 12(3), 520-4
- Eichenbaum, H., Cohen, N. J. (2001). From Conditioning to Conscious Recollection: Memory Systems of the Brain. *New York: Oxford University Press*
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 4, 495-516
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 6662, 43-50

- Endres, M., Kaps, M., Moskowitz, M. A. (1998) Apoptosis and ischemic infarct. *Nervenarzt* 69(6), 459-64
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25(9-10), 1439-51
- Esteves, A., Freitas, AC., Rossi-Junior, WC., Fernandes, GJM. (2013) Anatomical arrangement and distribution of the cerebral arterial circle in rats. *J Morphol Sci* 30(2):132-139
- Farkas, E., De Jong, G. I., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., Luiten, P. G. M. (2000) Pathological features of cerebral capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* (Berl) 100, 395-402
- Farkas, E., de Vos, R. A. I., Donka, G., Jansen Steur, E. N. H., Mihály, A., Luiten, P. G. M. (2006a) Age-related microvascular degeneration in the human cerebral periventricular white matter. *Acta Neuropathol* (Berl) 111, 150-157
- Farkas, E., de Wilde, M. C., Kiliaan, A. J., Luiten, P. G. M. (2002b) Systemic effects of dietary n-3 PUFA supplementation accompany changes of CNS parameters in cerebral hypoperfusion. *Ann N Y Acad Sci* 977, 77-86
- Farkas, E., de Wilde, M. C., Kiliaan, A. J., Meijer, J., Keijser, J. N., Luiten, P. G. M. (2002a) Dietary long chain PUFAs differentially affect hippocampal muscarinic 1 and serotonergic 1A receptors in experimental cerebral hypoperfusion. *Brain Res* 954, 32-41
- Farkas, E., Institóris, Á., Domoki, F., Mihály, A., Bari, F. (2006b) The effect of pre- and post-treatment with diazoxide on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 1087, 168-174
- Farkas, E., Luiten P. G. M., Bari, F. (2007) Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 54(1), 162-180
- Farkas, E., Luiten, P. G. M. (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64, 575-611
- Festjens, N., Cornelis, S., Lamkanfi, M., Vandenabeele, P. (2006) Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem* 387(8), 1005-16
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., Frackelton Jr, A. R. (2003) Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14(10), 1649-60
- Firbank, M. J., Harrison, R. M., O'Brien, J. T. (2002) A comprehensive review of proton magnetic resonance spectroscopy studies in dementia and Parkinson's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 14(2), 64-76
- Friedrich, P., Aszodi, A. (1991) MAP2: a sensitive cross-linker and adjustable spacer in dendritic architecture. *FEBS Lett* 295, 5-9
- Fujishima, M., Ogata, J., SUGI, T., Omae, T. (1976) Mortality and cerebral metabolism after bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39(3), 212-7

- Fuster, V., Kelly, B. B. (2010) Promoting Cardiovascular Health in the Developing World: A Critical Challenge to Achieve Global Health. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. *Washington (DC): National Academies Press (US)*
- Garcia-Segura, L. M., Azcoitia, I., DonCarlos, L. L. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63(1), 29-60
- Garcia-Segura, L. M., Cardona-Gomez, P., Naftolin, F., Chowen, J. A. (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport* 9(4), 593-7
- Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P. E., Didelot, C., Kroemer, G. (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 13(9), 1423-33
- Ginsberg, M. D., Busto R. (1989) Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke* 20(12), 1627-42
- Goldman-Rakic, P. S. (1996) The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351(1346), 1445-53
- Gollapudi, L., Oblinger, M. M. (1999) Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ERalpha-transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res* 56(5), 471-81
- Gollapudi, L., Oblinger, M. M. (1999) Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res* 56(1), 99-108
- Gordon, K. B., Macrae, I. M., Carswell, H. V. (2005) Effects of 17beta-oestradiol on cerebral ischaemic damage and lipid peroxidation. *Brain Res* 1036(1-2), 155-62
- Gorman, A. M., Orrenius, S., Ceccatelli, S. (1998) Apoptosis in neuronal cells: role of caspases. *Neuroreport* 9(10), R49-55
- Graham, S. H., Chen, J., Clark, R. S. (2000) Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17(10), 831-41
- Gray, E. G., Whittaker, V. P. (1962) The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat* 96, 79-88
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J. (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J* 17(14), 3878-85
- Gulinello, M., Lebesgue, D., Jover-Mengual, T., Zukin, R. S., Etgen, A. M. (2006) Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. *Horm Behav* 49(2), 246-60
- Gupta, S. (2000) Molecular and biochemical pathways of apoptosis in lymphocytes from aged humans. *Vaccine* 18(16), 1596-601
- Gupta, S. (2000) Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin Immunol* 20(4), 229-39
- Gupta, Y. K., Briyal S. (2004) Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *Indian J Physiol Pharmacol* 48(4), 379-94

- Hacker, G. (2000) The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 1, 5-17
- Had-Aissouni, L., Ré, D. B., Nieoullon, A., Kerkerian-Le, Goff, L. (2002) Importance of astrocytic inactivation of synaptically released glutamate for cell survival in the central nervous system are astrocytes vulnerable to low intracellular glutamate concentrations? *J Physiol Paris* 96(3-4), 317-22
- Hai, J., Lin, Q., Su, S. H., Zhang, L., Wan, J. F., Lu, Y. (2011) Chronic cerebral hypoperfusion in rats causes proteasome dysfunction and aggregation of ubiquitinated proteins. *Brain Res* 1374, 73-81
- Halliwell, B. (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344(8924), 721-4
- Harukuni, I., Bhardwaj A. (2006) Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 24, 1-21
- Herson, P. S., Koerner, I. P., Hurn, P. D. (2009) Sex, sex steroids, and brain injury. *Semin Reprod Med* 27(3), 229-39
- Hirabayashi, H., Takizawa, S., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Shinohara, Y. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist reduces nitrotyrosine formation in caudate-putamen in rat focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neurosci Lett* 299(1-2), 159-61
- Hodge, R. L., Lowe, R. D., Vane, J. R. (1966) Increased angiotensin formation in response to carotid occlusion in the dog. *Nature* 211, 491-493
- Hossmann, K. A. (1993) Ischemia-mediated neuronal injury. *Resuscitation* 26, 225-235
- Hossmann, K. A. (1997) Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock* 8, 95-101
- Hossmann, K. A. (2006) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1057-1083
- Hsu, C. Y. (1998) Ischemic Stroke: From Basic Mechanisms to New Drug Development. Karger
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., Goeddel, D. V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308
- Huang, J., Upadhyay, U. M., Tamargo, R. J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66(3), 232-45
- Huang, Y., Ray, S., Reed, J. C., Ibrado, A. M., Tang, C., Nawabi, A., Bhalla, K. (1997) Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat* 42(1), 73-81
- Inagaki, T., Etgen, A. M. (2013) Neuroprotective action of acute estrogens: animal models of brain ischemia and clinical implications. *Steroids* 78(6), 597-606
- Israels, L. G., Israels, E. D. (1999) Apoptosis. *Stem Cells* 5, 306-13
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., Ferri, K. F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y. Y., Mak, T. W., Zúñiga-Pflücker, J. C.,

- Kroemer, G., Penninger J. M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410(6828), 549-54
- Kandouz, M., Siromachkova, M., Jacob, D., Chretien Marquet, B., Therwath, A., Gompel, A. (1996) Antagonism between estradiol and progestin on Bcl-2 expression in breast-cancer cells. *Int J Cancer* 68(1), 120-5
- Karpiak, S. E., Li, Y. S., Mahadik, S. P. (1987) Gangliosides (GM1 and AGF2) reduce mortality due to ischemia: protection of membrane function. *Stroke* 18(1), 184-7
- Kawai, K., Nitecka, L., Ruetzler, C. A., Nagashima, G., Joó, F., Mies, G., Nowak Jr, T. S., Saito, N., Lohr, J. M., Klatzo, I. (1992) Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J Cereb Blood Flow Metab* (2), 238-49
- Kendal, C., Everall, I., Polkey, C., Al-Sarraj, S. (1999) Glial cell changes in the white matter in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 36(1), 43-51
- Khodabandehloo, F., Hosseini, M., Rajaei, Z., Soukhtanloo, M., Farrokhi, E., Rezaeipour, M. (2013) Brain tissue oxidative damage as a possible mechanism for the deleterious effect of a chronic high dose of estradiol on learning and memory in ovariectomized rats. *Arq Neuropsiquiatr* 71(5), 313-9
- Kim, J. S., Qian, T., Lemasters, J. J. (2003) Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology* 124(2), 494-503
- Kirino, T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239, 57-69
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A. (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12(6), 611-20
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M. (2006) A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma* 23(8), 1185-200
- Kohler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods* 1-2, 97-110
- Korsmeyer, S. J. (1999) Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect* 21-41
- Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E., Oltvai, Z. N. (1993) Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4(6), 327-32
- Krajewska, M., Wang, H. G., Krajewski, S., Zapata, J. M., Shabaik, A., Gascoyne, R., Reed, J. C. (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57(8), 1605-13
- Krajewski, S., Mai, J. K., Krajewska, M., Sikorska, M., Mossakowski, M. J., Reed, J. C. (1995) Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci* 15(10), 6364-76
- Krieger, E. M. (1963) Carotid occlusion in the rat: circulatory and respiratory effects. *Acta Physiol Lat Am* 13, 350-357

- Krupinski, J., Lopez, E., Marti, E., Ferrer, I. (2000) Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 7(4), 332-42
- Kumar, S., Flacke, J. P., Kostin, S., Appukuttan, A., Reusch, H. P., Ladilov, Y. (2011) SLC4A7 sodium bicarbonate co-transporter controls mitochondrial apoptosis in ischaemic coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res* 89(2), 392-400
- Kumar, V., Naik, R. S., Hillert, M., Klein, J. (2006) Effects of chloride flux modulators in an in vitro model of brain edema formation. *Brain Res* 1122(1), 222-9
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., Earnshaw, W. C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346-7
- Lebesgue, D., Chevalere, V., Zukin, R. S., Etgen, A. M. (2009) Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids* 74(7), 555-61
- Lenzsér, G., Kis, B., Bari, F., Busija, D. W. (2005) Diazoxide preconditioning attenuates global cerebral ischemia-induced blood-brain barrier permeability. *Brain Res* 1051, 72-80
- Li, J., Wu, H., Xue, G., Wang, P., Hou, Y. (2013) 17 β -Oestradiol Protects Primary-Cultured Rat Cortical Neurons from Ketamine-Induced Apoptosis by Activating PI3K/Akt/Bcl-2 Signalling. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* doi: 10.1111/bcpt.12124
- Li, X., Xu, Y., Ma, L., Sun, L., Fu, G., Hou, Y. (2009) 17 β -estradiol enhances the response of plasmacytoid dendritic cell to CpG. *PLoS One* 4(12), e8412
- Liu, B., Liao, M., Mielke, J. G., Ning, K., Chen, Y., El-Hayek, Y. H., Gomez, E., Zukin, R. S., Fehlings, M. G., Wan, Q. (2006) Ischemic insults direct glutamate receptor subunit 2-lacking AMPA receptors to synaptic sites. *J Neurosci* 26(20), 5309-5319
- Liu, H. X., Zhang, J. J., Zheng, P., Zhang, Y. (2005) Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res Mol Brain Res* 139, 169-177
- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J. (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501
- Love, S. (2003) Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2), 267-82
- Lowry, O. H., Passonneau, J. V., Hasselberger, F. X., Schultz, D. W. (1964) Effect of ischemia on known substrates and cofactors of glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* 239, 18-30
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-75
- MacManus, J. P., Linnik, M. D. (1997) Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* (8), 815-32

- Maragakis, N. J., Rothstein, J. D. (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* (12), 679-89
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L., Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87(1), 206-210
- Marosi, M., Rakos, G., Robotka, H., Nemeth, H., Sas, K., Kis, Z., Farkas, T., Lur, G., Vecsei, L., Toldi, J. (2006) Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods* 156, 231-235
- Marsden, V. S., Ekert, P. G., Van Delft, M., Vaux, D. L., Adams, J. M., Strasser, A. (2004) Bcl-2-regulated apoptosis and cytochrome c release can occur independently of both caspase-2 and caspase-9. *J Cell Biol* 6, 775-80
- Marsden, V. S., Strasser, A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 71-105
- Martin, L. J., Brambrink, A. M., Lehmann, C., Portera-Cailliau, C., Koehler, R. C., Rothstein, J., Traystman, R. J. (1997) Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 42, 335-348
- Martin, S. J., Newmeyer, D. D., Mathias, S., Farschon, D. M., Wang, H. G., Reed, J. C., Kolesnick, R. N., Green, D. R. (1995) Cell-free reconstitution of Fas-, UV radiation- and ceramide-induced apoptosis. *EMBO J* 14(21), 5191-200
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W., Tsuruo, T. (1997) Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14(9), 1007-12
- Mattson, M. P. (2006) Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal* 8(11-12), 1997-2006
- Mattson, M. P., Duan, W. (1999) "Apoptotic" Biochemical Cascades in Synaptic Compartments: Roles in Adaptive Plasticity and Neurodegenerative Disorders. *J Neurosci Res* 58, 152-166
- McEwen, B. (2002) Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57, 357-84
- McLaughlin, B. (2004) The kinder side of killer proteases: caspase activation contributes to neuroprotection and CNS remodeling. *Apoptosis* 9(2), 111-21
- McNeill, A. M., Zhang, C., Stanczyk, F. Z., Duckles, S. P., Krause, D. N. (2002) Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone. *Stroke* 33(6), 1685-91
- Merry, D. E., Korsmeyer, S. J. (1997) Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 20, 245-67
- Meffert, M. K., Baltimore, D. (2005) Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci* 1, 37-43
- Miller, D. K. (1999) Activation of apoptosis and its inhibition. *Ann N Y Acad Sci* 132-57

- Moser, M. B., Moser, E. I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8(6), 608-19
- Moss, R. L., Gu, Q. (1999) Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids* 64(1-2), 14-21
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K. A., Sawa, H., Nakayama, K., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., Loh, D. Y. (1995) Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267(5203), 1506-10
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H. (2003) Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10(1), 108-16
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A. J. (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3(9), 748-55
- Ni, B., Wu, X., Du, Y., Su, Y., Hamilton-Byrd, E., Rockey, P. K., Rosteck Jr, P., Poirier, G. G., Paul, S. M. (1997) Cloning and expression of a rat brain interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-related protease (IRP) and its possible role in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 17(5), 1561-9
- Ni, B., Wu, X., Su, Y., Stephenson, D., Smalstig, E. B., Clemens, J., Paul, S. M. (1998) Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(3), 248-56
- Ni, J., Ohta, H., Matsumoto, K., Watanabe, H. (1994) Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res* 653(1-2), 231-6
- Nicholson, D. W., Thornberry, N. A. (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8), 299-306
- Noppens, R. R., Kofler, J., Grafe, M. R., Hurn, P. D., Traystman, R. J. (2009) Estradiol after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation is neuroprotective and mediated through estrogen receptor-beta. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(2), 277-86
- O'Callaghan, J. P., Sriram, K. (2005) Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 4(3), 433-42
- Ogata, J., Fujishima, M., Morotom, L. Y., Omae, T. (1976) Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: a pathological study. *Stroke* 7, 54-64
- Ohtaki, H., Fujimoto, T., Sato, T., Kishimoto, K., Fujimoto, M., Moriya, M., Shioda, S. (2006) Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochir Suppl* 96, 283-287
- Oliver, F. J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M. C., de Murcia, G., Murcia, J. M. (1998) Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 273(50), 33533-9
- Olney, J. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164(880), 719-721

- Oltvai Z. N., Milliman, C. L., Korsmeyer, S. J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4), 609-19
- Otori, T., Katsumata, T., Muramatsu, H., Kashiwagi, F., Katayama, Y., Terashi, A. (2003) Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 266-272
- Ouyang, Y. B., Giffard, R. G. (2004) Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium* 36(3-4), 303-11
- Pan, J., Konstas, A. A., Bateman, B., Ortolano, G. A., Pile-Spellman, J. (2007) Reperfusion injury following cerebral ischemia: Pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 49(2), 93-102
- Panickar, K. S., Norenberg, M. D. (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 50, 287-298
- Panzica, G. C., Melcangi, R. C. (2008) The endocrine nervous system: source and target for neuroactive steroids. *Brain Res Rev* 57(2), 271-6
- Payan, H. M., Levine, S., Strebel, R. (1965) Effects of cerebral ischemia in various strains of rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 120(1), 208-9
- Pellegrini, L., Scorrano, L. (2007) A cut short to death: Parl and Opal in the regulation of mitochondrial morphology and apoptosis. *Cell Death Differ* 14(7), 1275-84
- Pelligrino, D. A., Santizo, R., Baughman, V. L., Wang, Q. (1998) Cerebral vasodilating capacity during forebrain ischemia: effects of chronic estrogen depletion and repletion and the role of neuronal nitric oxide synthase. *Neuroreport* 9(14), 3285-91
- Pérez-Álvarez, M. J., Maza Mdel, C., Anton, M., Ordoñez, L., Wandosell, F. (2012) Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 9, 157
- Petito, C. K., Feldmann, E., Pulsinelli, W. A., Plum, F. (1987) Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology* 37(8), 1281-6
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., Fesik, S. W. (2004) Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3), 83-94
- Plahta, W. C., Clark, D. L., Colbourne, F. (2004) 17beta-estradiol pretreatment reduces CA1 sector cell death and the spontaneous hyperthermia that follows forebrain ischemia in the gerbil. *Neuroscience* 129(1), 187-93
- Polster, B. M., Fiskum, G. (2004) Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis. *J Neurochem* 90(6), 1281-9
- Preston, E., Foster, D. O. (1997) Evidence for pore-like opening of the blood-brain barrier following forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 761, 4-10
- Pulsinelli, W. A., Buchan, A. M. (1988) The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913-914

- Roher, A. E., Debbins, J. P., Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Pipe, J. G., Maze, S., Belden, C., Maarouf, C. L., Thiyyagura, P., Mo, H., Hunter, J. M., Kokjohn, T. A., Walker, D. G., Kruchowsky, J. C., Belohlavek, M., Sabbagh, M. N., Beach, T. G. (2012) Cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Vasc Health Risk Manag* 8, 599-611
- Ross, A. M., Hurn, P., Perrin, N., Wood, L., Carlini, W., Potempa, K. (2007) Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 16(5), 203-7
- Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H., Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60(6), 614-32
- Rutledge, R. G., Côté, C. (2003) Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31(16), e93.
- Ryan, K. J. (1982) Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res* 42(8 Suppl), 3342s-3344s
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16), 2861-74
- Scheller, M. S., Grafe, M. R., Zornow, M. H., Fleischer, J. E. (1992) Effects of Ischemia Duration on Neurological Outcome, CA1 Histopathology, and Nonmatching to Sample Learning in Monkeys. *Stroke* 23, 1471-1476
- Schimmer, A. D. (2004) Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 64(20), 7183-90
- Schlageter, N. L., Carson, R. E., Rapoport, S. I. (1987) Examination of blood-brain barrier permeability in dementia of the Alzheimer type with [68Ga]EDTA and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 1-8
- Schlegel, J., Peters, I., Orrenius, S., Miller, D. K., Thornberry, N. A., Yamin, T. T. Nicholson, D. W. (1996) CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 271, 1841-4
- Schmidt-Kastner, R., Aguirre-Chen, C., Saul, I., Yick, L., Hamasaki, D., Busto, R., Ginsberg, M. D. (2005) Astrocytes react to oligemia in the forebrain induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res* 1052, 28-39
- Schreihöfer, D. A., Ma, Y. (2013) Estrogen receptors and ischemic neuroprotection: who, what, where, and when? *Brain Res* 1514, 107-22
- Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., Levy, A. P. (1999) Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 100(5), 547-52
- Schutta H. S., Lechtenberg, R. (1998) *Neurology practice guidelines*. New York: M. Dekker. ISBN 0-8247-0104-6
- Shaw, C. M., Alvord, E. C. (1997) Neuropathology of the limbic system. *Neuroimaging Clinics of North America* 7(1), 101-142
- Sherwin, B. B. (2007) The critical period hypothesis: can it explain discrepancies in the oestrogen-cognition literature? *J Neuroendocrinol* 19(2), 77-81

- Shi, J., Yang, S. H., Stubley, L., Day, A. L., Simpkins, J. W. (2000) Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res* 853(1), 1-4
- Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M., Yoshimura, A. (2012) Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 3, 132
- Shughrue, P. J., Merchenthaler, I. (2003) Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* 116(3), 851-61
- Simon, R. (2006) Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol* 63, 1368-1370
- Simpkins, J. W., Perez, E., Wang, X., Yang, S., Wen, Y., Singh, M. (2009) The potential for estrogens in preventing Alzheimer's disease and vascular dementia. *Ther Adv Neurol Disord* 2(1), 31-49
- Singer, C. A., McMillan, P. J., Dobie, D. J., Dorsa, D. M. (1998) Effects of estrogen replacement on choline acetyltransferase and trkA mRNA expression in the basal forebrain of aged rats. *Brain Res* 789(2), 343-6
- Singh, M., Sétáló Jr, G., Guan, X., Frail, D. E., Toran-Allerand, C. D. (2000) Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci* 20(5), 1694-700
- Smith, M. L., Auer, R. N., Seisjo, B. K. (1984) The density and distribution of ischaemic brain injury in the rat following 2–10 min of forebrain ischaemia. *Acta Neuropathol (Berl)* 64, 319-32
- Smith, S. (2001) The world according to PARP. *Trends Biochem Sci* 26(3), 174-9
- Smith, W. S., Sung, G., Starkman, S., Saver, J. L., Kidwell, C. S., Gobin, Y. P., Lutsep, H. L., Nesbit, G. M., Grobelny, T., Rymer, M. M., Silverman, I. E., Higashida, R. T., Budzik, R. F., Marks, M. P. (2005) Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke* 36, 1432-1438
- Snigdha, S., Smith, E. D., Prieto, G. A., Cotman, C. W. (2012) Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull* 28(1), 14-24
- Sopala, M., Danysz, W. (2001) Chronic cerebral hypoperfusion in the rat enhances age-related deficits in spatial memory *J Neural Transm* 108, 1445-1456
- Squire, L. R., Schacter, D. L. (2002) *Neuropsychology of Memory* (3rd edn). New York: Guilford Press
- Sribnick, E. A., Ray, S. K., Banik, N. L. (2004) Estrogen as a multi-active neuroprotective agent in traumatic injuries. *Neurochem Res* 29(11), 2007-14
- Stein, D. G. (2001) Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24(7), 386-91
- Stewart, P. A., Magliocco, M., Hayakawa, K., Farrell, C. L., Del Maestro, R. F., Girvin, J., Kaufmann, J. C., Vinters, H. V., Gilbert, J. (1987) A quantitative analysis of blood–brain barrier ultrastructure in the aging human. *Microvasc Res* 33, 270-282

- Strom, J. O., Ingberg, E., Theodorsson, E., Theodorsson, A. (2013) Effects of high and low 17 β -estradiol doses on focal cerebral ischemia: negative results. *Sci Rep* 3, 3111
- Strom, J. O., Theodorsson, A., Theodorsson, E. (2011) Mechanisms of estrogens' dose-dependent neuroprotective and neurodamaging effects in experimental models of cerebral ischemia. *Int J Mol Sci* 12(3), 1533-62
- Sudo, S., Wen, T. C., Desaki, J., Matsuda, S., Tanaka, J., Arai, T., Maeda, N., Sakanaka, M. (1997) Beta-estradiol protects hippocampal CA1 neurons against transient forebrain ischemia in gerbil. *Neurosci Res* 29(4), 345-54
- Suzuki, S., Brown, C. M., Wise, P. M. (2009) Neuroprotective effects of estrogens following ischemic stroke. *Front Neuroendocrinol* 30(2), 201-11
- Swenson, R. (2006) Review of clinical and functional neuroscience: Chapter 9-The limbic system. Retrieved from http://www.dartmouth.edu/~rswenson/NeuroSci/chapter_9.html
- Swenson, R. S., Sievert, C. F., Terreberry R. R., Neafsey, E. J., Castro A. J. (1989) Organization of cerebral cortico-olivary projections in the rat. *Neurosci Res* 7(1), 43-54
- Sylvia, V. L., Walton, J., Lopez, D., Dean, D. D., Boyan, B. D., Schwartz, Z. (2001) 17 beta-estradiol-BSA conjugates and 17 beta-estradiol regulate growth plate chondrocytes by common membrane associated mechanisms involving PKC dependent and independent signal transduction. *J Cell Biochem* 81(3), 413-29
- Tanaka, K., Fukuuchi, Y., Nogawa, S., Nozaki, H., Nagata, E., Suzuki, S., Dembo, T., Kosaka, A. (1999) Alteration of cAMP-mediated signal transduction in cerebral ischemia-binding activity of PKA and phosphorylation of CREB. *Rinsho Shinkeigaku* 39, 1298-1299
- Teixeira, C., Reed, J. C., Pratt, M. A. (1995) Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 55(17), 3902-7
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 5, 801-9
- Thornberry, N. A. (1997) The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53(3), 478-90
- Tomimoto, H., Ihara, M., Wakita, H., Ohtani, R., Lin, J. X., Akiguchi, I., Kinoshita, M., Shibasaki, H. (2003) Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. *Acta Neuropathol* 106(6), 527-34
- Tramontina, F., Tramontina, A. C., Souza, D. F., Leite, M. C., Gottfried, C., Souza, D. O., Wofchuk, S. T., Gonçalves, C. A. (2006) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 26(1), 81-6
- Traystman, R. J. (2003) Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* 44(2), 85-95

- Tsuchiya, M., Sako, K., Yura, S., Yonemasu, Y. (1992) Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res* 89(1), 87-92
- Ueda, H., Fujita, R. (2004) Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol Pharm Bull* 27, 950-955
- Ueda, K., Hayaishi, O. (1985) ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* 54, 73-100
- Vagnozzi, R., Tavazzi, B., Di Pierro, D., Giardina, B., Fraioli, B., Signoretti, S., Distefano, S., Galvano, M., Lazzarino, G. (1997) Effects of increasing times of incomplete cerebral ischemia upon the energy state and lipid peroxidation in the rat. *Exp Brain Res* 117(3), 411-8
- Van Eldik, L. J., Wainwright, M. S. (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21(3-4), 97-108
- Van Elzakker, M., O'Reilly, R. C., Rudy, J. W. (2003) Transitivity, flexibility, conjunctive representations, and the hippocampus. I. An empirical analysis. *Hippocampus* 13(3), 334-40
- Velier, J. J., Ellison, J. A., Kikly, K. K., Spera, P. A., Barone, F. C., Feuerstein, G. Z. (1999) Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 19(14), 5932-41
- Vicente, E., Boer, M., Leite, M., Silva, M., Tramontina, F., Porciúncula, L., Dalmaz, C., Gonçalves, C. A. (2004) Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats. *Neurotoxicology* 25(5), 771-7
- Vicente, E., Degerone, D., Bohn, L., Scornavaca, F., Pimentel, A., Leite, M. C., Swarowsky, A., Rodrigues, L., Nardin, P., de Almeida, L. M., Gottfried, C., Souza, D. O., Netto, C. A., Gonçalves, C. A. (2009) Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 1251, 204-12
- Villapol, S., Bonnin, P., Fau, S., Baud, O., Renolleau, S., Charriaut-Marlangue, C. (2009) Unilateral blood flow decrease induces bilateral and symmetric responses in the immature brain. *Am J Pathol* 175(5), 2111-20
- Wajant, H., Henkler, F., Scheurich, P. (2001) The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 13, 389-400
- Wakabayashi, T., Karbowski, M. (2001) Structural changes of mitochondria related to apoptosis. *Biol Signals Recept* 10(1-2), 26-56
- Wang, H. H., Chai, C. Y., Kuo, J. S., Wang, S. C. (1970) Participation of cardiac and peripheral sympathetics in carotid occlusion response. *Am J Physiol* 218, 1548-1554
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 22, 2922-33
- Wappler, E. A., Felszeghy, K., Szilágyi, G., Gál, A., Skopál, J., Mehra, R. D., Nyakas, C., Nagy, Z. (2010) Neuroprotective effects of estrogen treatment on ischemia-

- induced behavioural deficits in ovariectomized gerbils at different ages. *Behav Brain Res* 209(1), 42-8
- Wappler, E. A., Gál, A., Skopál, J., Nagy, Z. (2011) Single, high-dose 17 β -estradiol therapy has anti-apoptotic effect and induces cerebral plasticity following transient forebrain ischemia in gerbils (Short communication). *Acta Physiol Hung* 98(2), 189-94
- Wise, P. M., Dubal, D. B. (2000) Estradiol protects against ischemic brain injury in middle-aged rats. *Biol Reprod* 63(4), 982-5
- Wisniewski, H. M., Vorbrodt, A. W., Wegiel, J. (1997) Amyloid angiopathy and blood-brain barrier changes in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 826, 161-172
- Won, C. K., Kim, M. O., Koh, P. O. (2006) Estrogen modulates Bcl-2 family proteins in ischemic brain injury. *J Vet Med Sci* 68(3), 277-80
- Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., Arumugam, T. V. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6, 1-19
- Yang, B., El Nahas, A. M., Fisher, M., Wagner, B., Huang, L., Storie, I., Barnett, D., Barratt, J., Smith, A. C., Johnson, T. S. (2004) Inhibitors directed towards caspase-1 and -3 are less effective than pan caspase inhibition in preventing renal proximal tubular cell apoptosis. *Nephron Exp Nephrol* 96(2), e39-51
- Yong, Y., Xie, H. J., Zhang, Y. F., Yang, Q. D., Liao, D. F., Yang, H. L., Yan, P. K., Liu, Z. J. (2005) 17 β -estradiol potentiates ischemia-reperfusion injury in diabetic ovariectomized female rats. *Brain Res* 1054(2), 192-9
- Yoshida, S., Busto, R., Martinez, E., Scheinberg, P., Ginsberg, M. D. (1985) Regional brain energy metabolism after complete versus incomplete ischemia in the rat in the absence of severe lactic acidosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 5(4), 490-501
- Yoshida, S., Busto, R., Watson, B. D., Santiso, M., Ginsberg, M. D. (1985) Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin E. *J Neurochem* 44(5), 1593-601
- Yuan, P., Liu, Z., Liu, M., Huang, J., Li, X., Zhou, X. (2013) Up-regulated tumor necrosis factor-associated factor 6 level is correlated with apoptosis in the rat cerebral ischemia and reperfusion. *Neurol Sci* 34(7), 1133-8
- Zhang, F., Wang, Y., Wang, L., Luo, X., Huang, K., Wang, C., Du, M., Liu, F., Luo, T., Huang, D., Huang, K. (2013) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 is a key regulator of estrogen receptor α -dependent gene transcription. *J Biol Chem* 288(16), 11348-57
- Zimmer, C., Sampaolo, S., Sharma, H. S., Cervós-Navarro, J. (1991) Altered glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat brain following chronic hypoxia. *Neuroscience* 40(2), 353-61
- Zito, K., Scheuss, V. (2009) NMDA Receptor Function and Physiological Modulation. *Encyclopedia of Neuroscience* (6), 1157-1164
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., Svoboda, K. (2009) Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron* 61(2), 247-58
- Zlender, V. (2003) Apoptosis- programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol* 4, 267-74

www.chronopause.com

www.brainmeta.com

www.science.com

<http://science.howstuffworks.com>

www.nature.com

www.biologycorner.com/worksheets/rat_circulatory.html

PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Милош Р. Станојловић _____

број индекса _____ Б3010/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Ефекат естрадиола у модулатији апоптотских сигнала у можданој кори и
хипокампусу пацова током хроничне мождане хиперперфузије

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2014.

Milost Stanokovic

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Милош Р. Станојловић

Број индекса Б3010/2010

Студијски програм Експериментална неуробиологија од гена до понашања

Наслов рада Ефекат естрадиола у модулатији апоптотских сигнала у можданој
кори и хипокампусу пацова током хроничне мождане хиперперфузије

Ментор др Надежда Недељковић и др Дуња Дракулић

Потписани/а Милош Р. Станојловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2014.

Miloy Stojilovic

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ефекат естрадиола у модулацији апоптотских сигнала у мозданој кори
и хипокампусу пацова током хроничне моздане хиперфузије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.04.2014.

Milica Stojković

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Biografija autora

Miloš Stanojlović je rođen 25.03.1983. godine u Boru. Gimnaziju „Bora Stanković” je završio 2002. i iste godine upisao Biološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, odsek Genetički inženjering i primenjena biotehnologija. Diplomirao je 19.4.2010. sa srednjom ocenom 8.63 i ocenom 9 na diplomskom ispitu.

Doktorske studije na Katedri za Neuronauke, smer Eksperimentalna neurobiologija od gena do ponašanja, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, je upisao školske 2010/2011. godine. Od 02.02.2011. godine je zaposlena kao istraživač-pripravnik na projektu **„Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara”**, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u periodu 2011-2014. godine (173044), pod rukovodstvom dr Anice Horvat, naučnog savetnika Univerziteta u Beogradu, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”.

Od 2013.– do danas je zaposlen kao istraživač-saradnik na projektima: **„Molekularni mehanizmi patofizioloških promena u ćelijama nervnog sistema i perifernog tkiva kod sisara”**, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (173044), pod rukovodstvom dr Anice Horvat, naučnog savetnika Univerziteta u Beogradu, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”. Takođe, kao istraživač-saradnik je uključen na projekat **„Ćelijska i molekulska osnova neuroinflamacije: potencijalna ciljna mesta za translacionu medicinu i terapiju”**, finansiranom od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (41014), pod rukovodstvom dr Sanje Peković, naučnog savetnika Univerziteta u Beogradu, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Autor je dva i koautor pet radova u međunarodnim časopisima, kao i brojnih međunarodnih i domaćih kongresnih saopštenja štampanih u celini i izvodu.